

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE
EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SEMENTE DE UVA E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS COMPOSTOS
EXTRAÍDOS.**

Lisiane dos Santos Freitas

Tese de Doutorado

PORTO ALEGRE

Mai 2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS DE
EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE SEMENTE DE UVA E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS COMPOSTOS
EXTRAÍDOS.**

Lisiane dos Santos Freitas

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de
Química da UFRGS como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor
em Química*

PORTO ALEGRE

Mai 2007

DECLARAÇÃO DE AUTORIA

Este trabalho foi realizado pela autora, orientado pela Prof^a Dr^a Elina Bastos Caramão. O trabalho foi desenvolvido no laboratórios de pesquisa E-202, e central analítica, do Instituto de Química da UFRGS. A parte relativa à SFE foi realizada no laboratório de Altas Pressões da URI, Campus de Erechim, sob a supervisão do prof. Dr. Cláudio Dariva. Uma parte das análises por HPLC/UV-Vis foi realizada na ULBRA, sob a supervisão do prof. Dr. Marc François Richter.

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química Analítica e Ambiental e aprovada em sua forma final, pela orientadora e pela banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Elina Bastos Caramão

Banca Examinadora:

Dr. Cláudio Dariva (UNIT, Aracajú)

Prof^a. Dr^a. Rosana Schneider (UNISC, Santa Cruz do Sul)

Prof^a. Dr^a. Márcia Martinelli (PPGQ/UFRGS, Porto Alegre)

Prof^a. Dr^a. Claudia Alcaraz Zini (PPGQ/UFRGS, Porto Alegre)

Prof^a. Dr^a. Nádyá Pesce da Silveira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação Química

"O começo da sabedoria é encontrado na dúvida;
duvidando começamos a questionar,
e procurando podemos achar a verdade."
(Pierre Abelard)

Apreendi que, quanto mais corremos atrás dos nossos sonhos, mais sentimos vontade de conseguir conciliar a aprendizagem, o sucesso e a essência da vida com as pessoas que amamos.

Em especial aos meus pais, irmãos, sobrinhos e esposo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande Sul (UFRGS) por fornecer suporte institucional e instalações para o trabalho experimental;

À Professora Doutora Elina Bastos Caramão pelo incentivo, apoio, comprometimento profissional, amizade e orientação durante a construção da minha vida acadêmica;

Aos colegas, do laboratório de Química Ambiental e Oleoquímica da UFRGS pelo apoio e colaboração na tese desenvolvida;

Aos amigos Cecília, Eniz, Fernanda, Inês, Pedro e Regina pela amizade, carinho, incentivo e suporte nos momentos difíceis deste trabalho.

As bolsistas Carolina, Tainá e Bruna pela ajuda e comprometimento no estudo desenvolvido.

Aos meus pais, irmãos e esposo pelo incentivo, carinho, apoio e compreensão dado ao longo desta caminhada.

As professores Dr. Cláudio Dariva, Dr. José Vladimir de Oliveira, Dr. Marc Richter e Dra Márcia Martinelli pela confiança, apoio e suporte para a realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

| | | pág. |
|---------|--|-------|
| | Índice Geral..... | v |
| | Índice de Tabelas..... | x |
| | Índice de Figuras..... | xiii |
| | Listas de Abreviaturas e Siglas..... | xviii |
| | Resumo..... | xxi |
| | Abstract..... | xxii |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1 | Objetivos geral e objetivos específicos..... | 3 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 4 |
| 2.1 | Aspectos relevantes sobre o cultivo da uva..... | 4 |
| 2.2 | Características dos óleos e gorduras vegetais..... | 8 |
| 2.3 | Métodos empregados na extração de óleos..... | 10 |
| 2.3.1 | Métodos clássicos de extração..... | 10 |
| 2.3.2 | Extração com ultra som..... | 11 |
| 2.3.3 | Extração com líquido pressurizado (PLE)..... | 12 |
| 2.3.4 | Extração com fluido supercrítico (SFE)..... | 13 |
| 2.3.4.1 | Solventes utilizados na extração com fluido supercrítico. | 16 |
| 2.3.4.2 | Interação de solventes modificadores para fluido supercrítico..... | 19 |
| 2.3.4.3 | Extração de sólidos com fluido supercrítico..... | 20 |
| 2.3.5 | Comentários sobre métodos de extração..... | 21 |
| 2.4 | Composição dos óleos vegetais..... | 23 |
| 2.4.1 | Glicerídeos e ácidos graxos..... | 23 |
| 2.4.2 | Fitosteróis em óleos vegetais..... | 24 |
| 2.4.3 | Compostos antioxidantes presentes em óleos vegetais..... | 26 |
| 2.4.3.1 | Vitamina E..... | 26 |
| 2.4.3.2 | Compostos fenólicos..... | 27 |
| 2.5 | Técnicas para a análise de compostos orgânicos presentes em óleos... | 29 |
| 2.6 | Derivatização..... | 30 |
| 2.7 | Planejamento experimental..... | 31 |
| 3 | PARTE EXPERIMENTAL..... | 33 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 3.1 | Delineamento da pesquisa..... | 33 |
| 3.2 | Preparação da amostra..... | 34 |
| 3.3 | Padrões e reagentes..... | 36 |
| 3.4 | Extrações das amostras..... | 36 |
| 3.4.1 | Extrações clássicas..... | 36 |
| 3.4.1.1 | Extração por prensagem..... | 36 |
| 3.4.1.2 | Extração com Soxhlet (SOX)..... | 36 |
| 3.4.2 | Extrações não clássicas..... | 38 |
| 3.4.2.1 | Extração com ultra-som (US) | 38 |
| 3.4.2.2 | Extração com líquido pressurizado (PLE) | 40 |
| 3.4.2.3 | Extração com fluido supercrítico (SFE) | 43 |
| 3.5 | Análise dos óleos de semente de uva..... | 45 |
| 3.5.1 | Ácidos graxos totais (AGT) | 46 |
| 3.5.2 | Compostos voláteis não ligados ao glicerol..... | 49 |
| 3.5.3 | Triacilglicerol (TG)..... | 51 |
| 3.5.4 | Compostos antioxidantes..... | 52 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 55 |
| 4.1 | Estudo comparativo dos métodos de extração dos óleos de semente de uva: eficiência da extração..... | 56 |
| 4.1.1 | Extrações clássicas: prensagem e Soxhlet..... | 56 |
| 4.1.2 | Extrações modernas: ultra-som, líquido pressurizado e fluido supercrítico | 57 |
| 4.1.2.1 | Ultra-som..... | 57 |
| 4.1.2.2 | Extração com líquido pressurizado (PLE) | 60 |
| 4.1.2.2.1 | Análise dos resíduos | 68 |
| 4.1.2.2.2 | Extração com líquido pressurizado aplicada a sementes de diferentes variedades de uva..... | 70 |
| 4.1.2.3 | Extração com fluido supercrítico (SFE)..... | 71 |
| 4.1.2.3.1 | Extração com fluido supercrítico com solventes modificadores em CO ₂ | 75 |
| 4.2 | Análise qualitativa e quantitativa dos óleos de sementes de uva Isabel/Herbemont obtidos pelos diferentes processos de extrações estudadas neste trabalho..... | 80 |
| 4.2.1.1 | Análise qualitativa dos ácidos graxos totais..... | 80 |
| 4.2.1.2 | Análise quantitativa dos ácidos graxos totais..... | 83 |
| 4.2.1.2.1 | Óleos de semente de uva comerciais e obtidos por métodos clássicos (prensagem e Soxhlet)..... | 86 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| 4.2.1.2.2 | Óleos de semente de uva extraídos por extração com líquido pressurizado..... | 86 |
| 4.2.1.2.3 | Óleos de semente de uva extraídos por extração com fluido supercrítico..... | 93 |
| 4.2.1.3 | Considerações finais sobre ácidos graxos totais nos óleos de semente de uva..... | 96 |
| 4.2.2 | Compostos voláteis não ligados ao glicerol: fração insaponificável..... | 96 |
| 4.2.2.1 | Análise qualitativa da fração insaponificável..... | 96 |
| 4.2.2.1.1 | Extração com líquido pressurizado (PLE)..... | 100 |
| 4.2.2.1.2 | Extração com fluido supercrítico (SFE)..... | 104 |
| 4.2.2.2 | Ánálise quantitativa da fração insaponificável..... | 109 |
| 4.2.2.2.1 | Óleos de semente de uva comerciais e obtidos por técnicas clássicas (prensagem e Soxhlet)..... | 109 |
| 4.2.2.2.2 | Óleos de semente de uva extraídos por PLE..... | 113 |
| 4.2.2.2.3 | Óleos de semente de uva extraídos por SFE..... | 118 |
| 4.2.2.3 | Considerações finais sobre a fração insaponificável nos óleos de semente de uva..... | 120 |
| 4.2.3 | Triacilglicerol (TG)..... | 121 |
| 4.2.3.1 | Desenvolvimento da metodologia..... | 121 |
| 4.2.3.2 | Análise de triacilglicerol nos óleos de semente de uva comerciais e obtidos por técnicas clássicas (prensagem e Soxhlet) | 121 |
| 4.2.3.3 | Análise de triacilglicerol nos óleos de semente de uva extraídos com líquido pressurizado..... | 123 |
| 4.2.3.4 | Análise de triacilglicerol nos óleos de semente de uva extraídos com fluido supercrítico..... | 126 |
| 4.2.3.5 | Considerações finais sobre triacilglicerol nos óleos de semente de uva..... | 132 |
| 4.2.4 | Compostos antioxidantes..... | 135 |
| 4.2.4.1 | Análise de catequinas..... | 136 |
| 4.2.4.2 | Análise de vitamina E..... | 136 |
| 4.2.4.2.1 | Desenvolvimento da metodologia..... | 138 |
| 4.2.4.2.2 | Análise de vitamina e nos óleos de semente de uva comerciais e obtidos por técnicas clássicas (prensagem e Soxhlet)..... | 138 |
| 4.2.4.2.3 | Análise de vitamina e nos óleos de semente de uva extraídos com líquido pressurizado..... | 140 |
| 4.2.4.2.3.1 | Análise de resíduos..... | 141 |
| 4.2.4.2.4 | Análise de vitamina e nos óleos de semente de uva extraídos com líquidos pressurizados..... | 147 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 4.2.4.3 | Considerações finais sobre vitamina E nos óleos de semente de uva..... | 149 |
| 4.3 | Análise qualitativa e quantitativa dos óleos extraídos de diferentes variedades de sementes de uva..... | 153 |
| 4.3.1 | Ácidos graxos totais (AGT)..... | 155 |
| 4.3.2 | Compostos voláteis não ligados ao glicerol: fração insaponificável | 155 |
| 4.3.2.1 | Análise qualitativa da fração insaponificável..... | 159 |
| 4.3.2.1.1 | Extrações clássicas: prensagem e Soxhlet..... | 159 |
| 4.3.2.1.2 | Extração com líquido pressurizado (PLE)..... | 159 |
| 4.3.2.2 | Análise quantitativa da fração insaponificável..... | 161 |
| 4.3.2.2.1 | Extrações clássicas: prensagem e Soxhlet..... | 163 |
| 4.3.2.2.2 | Extração com líquido pressurizado (PLE)..... | 163 |
| 4.3.3 | Triacilglicerol (TG)..... | 165 |
| 4.3.3.1 | Extrações clássicas: prensagem e Soxhlet..... | 167 |
| 4.3.3.2 | Extração com líquido pressurizado (PLE)..... | 171 |
| 4.3.4 | Compostos antioxidantes – vitamina E..... | 172 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 176 |
| 5.1 | Conclusões Gerais..... | 176 |
| 5.2 | Conclusões Específicas..... | 177 |
| 5.2.1 | Quanto a metodologia de extração..... | 177 |
| 5.2.1.1 | Extração com Ultra-som..... | 177 |
| 5.2.1.2 | Extração com Líquido Pressurizado..... | 177 |
| 5.2.1.3 | Extração com Fluido Supercrítico..... | 178 |
| 5.3 | Quanto ao método de análise..... | 178 |
| 5.4 | Quanto aos compostos identificados..... | 179 |
| 6 | PROPOSTAS DE TRABALHOS FUTUROS..... | 181 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 183 |
| 9 | CURRICULUM DA AUTORA..... | 192 |
| 8 | ANEXOS..... | 195 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | pág. |
|---|------|
| Tabela I: Levantamento realizado pela Embrapa – quantidade dos produtos exportados, pela vitivinicultura do Rio grande do Sul.... | 6 |
| Tabela II: Quantidade de uvas (em Kg) processadas nas vinícolas do Rio Grande do Sul entre 2000 e 2005..... | 7 |
| Tabela III: Principais ácidos graxos dos óleos vegetais, segundo a ANVISA..... | 9 |
| Tabela IV: Aplicações dos processos de SFE em óleos..... | 16 |
| Tabela V: Solventes mais utilizados na extração supercrítica..... | 17 |
| Tabela VI: Extrações com CO ₂ supercrítico utilizando co-solventes..... | 20 |
| Tabela VII: Comparação de metodologias analíticas..... | 22 |
| Tabela VIII: Teores de vitamina E encontrados em óleo de diferentes variedades de sementes de uva e diferentes processos de extração..... | 27 |
| Tabela IX: Matriz utilizada no Planejamento fatorial 2 ³ com Ultra-som..... | 40 |
| Tabela X: Matriz do planejamento experimental 2 ⁵⁻¹ para a extração com PLE..... | 42 |
| Tabela XI: Experimentos realizados utilizando CO ₂ como solvente supercrítico..... | 44 |
| Tabela XII: Experimentos realizados utilizando propano como solvente supercrítico..... | 44 |
| Tabela XIII: Quantidade de etanol utilizado no segundo grupo de experimentos..... | 45 |
| Tabela XIV: Ésteres utilizados para a análise quantitativa de ácidos graxos totais..... | 48 |
| Tabela XV: Íons monitorados dos analitos quantificados nas amostras de óleos..... | 50 |
| Tabela XVI: Composição de triglicerídeos e seus números de carbonos equivalentes..... | 52 |
| Tabela XVII: Composição do gradiente de fase para a análise por HPLC dos compostos fenólicos..... | 53 |
| Tabela XVIII: Concentração de vitamina E utilizada para a construção da curva de calibração..... | 54 |
| Tabela XIX: Variação do rendimento em massa para os óleos extraídos de semente de uva pelos métodos de prensagem e Soxhlet..... | 56 |
| Tabela XX: Variação do rendimento em massa para extração com ultra-som do óleo de semente de uva usando 3 g de semente de uva e 100 mL de solvente..... | 58 |

| | | |
|----------------|--|-----|
| Tabela XXI: | Rendimento em massa dos óleos obtidos por ultra-som usando o planejamento experimental descrito na Tabela V, com a amostra de semente de uva Isabel/ Herbemont..... | 59 |
| Tabela XXII: | Variação do rendimento em massa de óleo extraído por PLE, de acordo com as variáveis estudadas no planejamento experimental fatorial 2^{5-} | 61 |
| Tabela XXIII: | Coeficientes obtidos da análise de todos os parâmetros utilizados na extração com PLE..... | 65 |
| Tabela XXIV | Extrações de sementes de uvas em hexano utilizando PLE na melhor condição do planejamento experimental..... | 71 |
| Tabela XXV: | Extrações realizadas com fluxo de 2 mL min^{-1} com CO_2 como solvente supercrítico para a amostra da mistura das variedades Isabel e Herbemont..... | 72 |
| Tabela XXVI: | Propriedades dos solventes modificadores usados na SFE com CO_2 | 76 |
| Tabela XXVII: | Resultados e condições para as extrações do óleo de semente de uva utilizando SFE com CO_2 e 10% dos solventes modificadores na pressão de 181 bar e temperatura de 45°C | 77 |
| Tabela XXVIII: | Resultados e condições para as extrações do óleo de semente de uva utilizando SFE com CO_2 e etanol como solvente modificador na pressão de 181 bar e temperatura de 45°C | 78 |
| Tabela XXIX: | Identificação de picos presentes na Figura 23..... | 82 |
| Tabela XXX: | Quantificação de ácidos graxos totais em óleo de semente de uva (comercial e extraído por prensagem e Soxhlet da mistura de sementes de uva Isabel e Herbemont) e comparação com dados da ANVISA..... | 85 |
| Tabela XXXI: | Coeficientes do modelo construído para os ácidos graxos majoritários nos óleos extraídas por PLE com diferentes solventes da mistura de sementes de uva das variedades Isabel e Herbemont..... | 87 |
| Tabela XXXII: | Variação da concentração dos ácidos graxos totais em óleo de semente de uva extraído por SFE em CO_2 e em propano, expressos em porcentagem..... | 94 |
| Tabela XXXIII: | Variação da concentração dos ácidos graxos totais em óleo de semente de uva extraído por SFE em CO_2 com adição 10% de solvente modificador a 45°C e 181 bar. Valores expressos em porcentagem..... | 95 |
| Tabela XXXIV: | Identificação dos picos presentes na Figura 22..... | 99 |
| Tabela XXXV: | Análise qualitativa do planejamento experimental com hexano na extração com líquido pressurizado, aplicado à mistura de sementes de uva Isabel e Herbemont..... | 102 |
| Tabela XXXVI: | Compostos identificados na caracterização dos compostos extraídos por SFE com CO_2 e propano como solventes..... | 105 |

| | | |
|-----------------|--|-----|
| Tabela XXXVII: | Compostos identificados na caracterização dos compostos extraídos por SFE com diferentes solventes modificadores..... | 107 |
| Tabela XXXVIII: | Compostos presentes na fração não ligada ao glicerol do óleo de semente de uva..... | 111 |
| Tabela XXXIX: | Coeficientes dos modelos estatísticos construído para ésteres etílicos em amostras de óleos extraídas por PLE, usando diferentes solventes extratores..... | 114 |
| Tabela XL: | Coeficientes dos modelos construídos para ácidos graxos livres em amostras de óleos extraídas por PLE..... | 116 |
| Tabela XLI: | Quantificação de triglicerídeos em óleos comerciais de semente de uva e extraídos por prensagem, expressos em porcentagem..... | 123 |
| Tabela XLII: | Coeficientes dos modelos construídos para ECN-42 em amostras de óleos extraídas por PLE..... | 130 |
| Tabela XLIII: | Coeficientes dos modelos construídos para ECN – 44 em amostras de óleos extraídas por PLE..... | 131 |
| Tabela XLIV: | Coeficientes dos modelos construídos para ECN – 46 em amostras de óleos extraídas por PLE..... | 132 |
| Tabela XLV: | Concentração de α -tocoferol em amostras de óleo de semente de uva, extraídas por PLE..... | 142 |
| Tabela XLVI: | Quantificação de ácidos graxos totais em óleo de semente de uva extraído por prensagem, Soxhlet e PLE, expressos em porcentagem de massa e comparação com dados da ANVISA... | 156 |
| Tabela XLVII: | Compostos identificados na caracterização dos óleos de diferentes variedades de semente de uva em extrações clássicas: prensagem e Soxhlet..... | 160 |
| Tabela XLVIII: | Compostos identificados nos extratos hexânicos das diferentes variedades de uvas usando PLE..... | 162 |
| Tabela XLIX: | Quantificação de triglicerídeos em óleos de semente de uva de diferentes variedades, extraídos por prensagem e expressos em porcentagem..... | 167 |
| Tabela L | Quantificação de triglicerídeos em óleos de diferentes espécies de semente de uva extraídos por Soxhlet, expressos em porcentagem..... | 170 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | pág. |
|--|------|
| Figura 1: Diagrama de fases..... | 14 |
| Figura 2: Estrutura básica dos fitosteróis e as diferentes ramificações..... | 25 |
| Figura 3: Estrutura básica dos flavonóides..... | 28 |
| Figura 4: Compostos fenólicos presentes na casca e na semente de uva..... | 29 |
| Figura 5: Reação de esterificação do ácido palmítico com metanol, catalisada pelo trifluoreto de boro..... | 30 |
| Figura 6: Reação de silição do ácido palmítico com BSTFA e TMCS..... | 31 |
| Figura 7: Organograma geral usado para o desenvolvimento do trabalho experimental..... | 34 |
| Figura 8: Fotografia da célula extratora (a) e prensa utilizada (b) na extração do óleo de semente de uva..... | 37 |
| Figura 9: Esquema do extrator de Soxhlet com amostra de semente de uva..... | 38 |
| Figura 10: Esquema do Ultra-som utilizado para a extração óleo de semente de uva..... | 39 |
| Figura 11: Equipamento de Extração acelerada por solventes da Dionex (ASE 300TM)..... | 41 |
| Figura 12: Esquema do procedimento de extração com PLE..... | 41 |
| Figura 13: Fotografia do sistema utilizado para as extrações com fluidos supercríticos..... | 43 |
| Figura 14: Esquema da análise cromatográfica do óleo de semente de uva..... | 46 |
| Figura 15: Comparação gráfica entre os resultados de resíduos obtidos com hexano, a solução hexano:DCM (1:1), DCM e acetato de etila (Tabela XXIII) em PLE para o planejamento semi-fatorial 2^{5-1} | 69 |
| Figura 16: Variação do rendimento com o tempo para extrações subcríticas e supercríticas realizadas com CO ₂ , em diferentes condições de temperatura, densidade reduzida e pressão, para a amostra de sementes de uva tipo Isabel e Herbemont..... | 72 |
| Figura 17: Variação do rendimento com o tempo para extrações subcríticas e supercríticas realizadas com propano, em diferentes condições de temperatura, densidade reduzida e pressão, para a amostra de | 74 |

| | |
|--|-----|
| sementes de uva tipo Isabel e Herbemont..... | |
| Figura 18: Variação do rendimento com o tempo para extrações supercríticas realizadas com CO ₂ e adição de 10 % de solventes modificadores na pressão de 181 bar e temperatura de 45°C, para a amostra de sementes de uva tipo Isabel e Herbemont..... | 77 |
| Figura 19: Variação do rendimento com o tempo para extrações supercríticas realizadas com CO ₂ e adição de etanol como solvente modificador na pressão de 181 bar e temperatura de 45°C, para a amostra de sementes de uva tipo Isabel e Herbemont..... | 79 |
| Figura 20: Cromatogramas do Íon Total das amostras de óleo de semente de uva derivatizadas com BF ₃ em metanol: (a) óleo Borges, (b) óleo Ipiranga e (c) óleo de prensagem de semente de uva Isabel/Herbemont..... | 81 |
| Figura 21: Cromatogramas (GC/MS – modo SIM) para a quantificação de AGT (a) óleo obtido por prensagem de sementes de uva da mistura de Isabel e Herbemont e (b) dos padrões utilizados para quantificação dos AGT na forma de ésteres metílicos..... | 84 |
| Figura 22: Cromatogramas do Íon Total das amostras de óleo de semente de uva derivatizadas com BSTFA: (a) óleo Borges, (b) óleo Ipiranga, (c) óleo de prensagem de semente de uva Isabel/Herbemont e (d) óleo de extração em Soxhlet de semente de uva Isabel/Herbemont..... | 98 |
| Figura 23: Cromatograma do Íon Total para o óleo extraído por PLE da mistura das variedades de uvas Isabel/Herbemont, com hexano como solvente | 101 |
| Figura 24: Esquema da reação de derivatização de fitosteróis com trimetil silano. | 104 |
| Figura 25: Cromatograma no modo SIM da mistura de padrões (a) e da prensagem do óleo Isabel/Herbemont (b) para análise qualitativa de compostos insaponificáveis..... | 109 |
| Figura 26: Concentração de ácidos graxos livres, ésteres metílicos e ésteres etílicos em amostras de prensagem e Soxhlet do óleo de semente de uva Isabel/Herbemont e amostras comerciais..... | 112 |
| Figura 27: Análise quantitativa de compostos não ligados ao glicerol em amostras de óleo de semente de uva extraídas por SFE..... | 119 |
| Figura 28: Representação gráfica do óleo de soja e dos padrões de triglicerídeos. La: láurico, P: palmítico, L: linoléico, O: oléico, St esteárico..... | 121 |
| Figura 29: Representação gráfica do óleo de soja e da amostra para fins farmacêuticos (B). P: palmítico, L: linoléico, O: oléico, Ln: linolênico, St esteárico..... | 122 |
| Figura 30: Gráfico da relação entre número equivalente de carbonos (ECN) e percentual de triglicerídeos para amostras comerciais (a) amostras | 124 |

| | | |
|------------|---|-----|
| | para fins farmacêuticos e amostras extraídas por prensagem e Soxhlet | |
| Figura 31: | Cromatogramas da análise de triglicerídeos em (a) óleo de soja e (b) óleo de semente de uva Isabel/Herbemont;..... | 125 |
| Figura 32: | Quantificação dos triglicerídeos, expresso em ECN, das amostras de óleo de semente de uva extraída por PLE em hexano..... | 126 |
| Figura 33: | Quantificação dos triglicerídeos, expresso em ECN, das amostras de óleo de semente de uva extraída por PLE em solução de hexano: DCM (1:1)..... | 127 |
| Figura 34: | Quantificação dos triglicerídeos, expresso em ECN, das amostras de óleo de semente de uva extraída por PLE em DCM..... | 127 |
| Figura 35: | Quantificação dos triglicerídeos, expresso em ECN, das amostras de óleo de semente de uva extraída por PLE em acetato de etila. | 128 |
| Figura 36: | Análise quantitativa de triglicerídeos em amostras extraídas por SFE em CO ₂ e propano..... | 133 |
| Figura 37: | Análise quantitativa de triglicerídeos em amostras extraídas por SFE em CO ₂ utilizando 10% de solventes modificadores. (H) hexano, (HD) solução hexano:DCM (1:1), (AE) acetato de etila e (MeOH) metanol. | 134 |
| Figura 38: | Análise quantitativa de triglicerídeos em amostras extraídas por SFE em CO ₂ utilizando etanol como solvente modificador em diferentes concentrações..... | 135 |
| Figura 39: | Análise de catequinas em (a) padrão (b) amostra de óleo prensado das uvas Isabel/Herbemont (c) amostra de óleo de semente de uva Isabel/Herbemont extraído por PLE em hexano..... | 137 |
| Figura 40: | Determinação gráfica da faixa de linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação do α – tocoferol..... | 139 |
| Figura 41: | Cromatogramas do padrão de α – tocoferol (a) e de óleo de semente de uva extraída por Soxhlet (b)..... | 140 |
| Figura 42: | Concentração de α – tocoferol (% mg g ⁻¹) em amostras comerciais, (a) amostra para fins alimentícios e (b) amostras para fins farmacêuticos, e amostras extraídas por prensagem e Soxhlet..... | 141 |
| Figura 43: | Comparação entre os valores experimentais de extração com hexano, hexano:DCM, DCM e acetato de etila em PLE e o valores propostos pelo modelo do planejamento semi-fatorial..... | 148 |
| Figura 44: | Quantificação de vitamina E em óleo de semente de uva, extraídas por SFE com CO ₂ e propano..... | 150 |
| Figura 45: | Quantificação de vitamina E em óleo de semente de uva, expressos em porcentagem, extraídas por SFE em CO ₂ com adição de etanol | 151 |

| | |
|---|-----|
| como solvente modificador a 45°C e 181 bar..... | |
| Figura 46: Quantificação de vitamina E em óleo de semente de uva, extraído por SFE em CO ₂ com adição 10% de solvente modificador a 45°C e 181 bar..... | 152 |
| Figura 47: Comparação dos melhores resultados para a quantificação de vitamina E em amostras extraídas com CO ₂ | 153 |
| Figura 48: Comparação dos melhores resultados para a quantificação de vitamina E em amostras extraídas com diferentes métodos de extração..... | 154 |
| Figura 49: Variação da concentração dos ácidos palmítico, linoléico, oléico e esteárico de diferentes variedade de semente de uva extraído por prensagem, Soxhlet e PLE..... | 157 |
| Figura 50: Cromatogramas do Íon Total para os óleos obtidos por PLE com hexano, das diferentes variedades de sementes da uva e cromatogramas expandido da região de 6 à 45 minutos dos óleos (a) Herbemont/Isabel, (b) Seibel/Isabel, (c) Isabel, (d) Merlot, (e) Moscatel e (f) Cabernet, derivatizadas com BSTFA..... | 161 |
| Figura 51: Cromatograma do íon monitorado (MIC) do óleo de prensagem das sementes de uva da variedade Isabel/Seibel..... | 164 |
| Figura 52: Análise quantitativa de compostos não ligados ao glicerol em amostras de diferentes variedades de sementes de uva extraídas por prensagem e Soxhlet..... | 164 |
| Figura 53: Análise quantitativa de compostos não ligados ao glicerol em amostras de diferentes variedades de semente de uva extraídas por PLE..... | 166 |
| Figura 54: Gráfico da relação entre número equivalente de carbonos (ECN) e percentual de triglicerídeos para os óleos das diferentes variedades de uva analisadas..... | 169 |
| Figura 55: Cromatogramas da análise de triglicerídeos em (a) óleo de soja e (b) óleo de semente de uva Cabernet..... | 170 |
| Figura 56: Gráfico da relação entre número equivalente de carbonos (ECN) e percentual de triglicerídeos para os óleos das diferentes variedades de uvas analisadas extraídos por PLE..... | 171 |
| Figura 57: Concentração de α – tocoferol (mg Vit E/100 mg de óleo) em amostras amostras extraídas por prensagem, Soxhlet e PLE das sementes de diferentes variedades de uva..... | 173 |

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| AE | acetato de etila |
| AGT | ácidos graxos totais |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AOAC | <i>American Oil Chemist's Society</i> |
| ASE | <i>Accelerated Solvent Extraction</i> , Extração Acelarada com Solvente |
| BF ₃ | tri-fluoreto de boro |
| BSTFA | n,o-bis trimetilsilil-trifluor acetamida |
| CA | Cabernet |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| DCM | diclorometano |
| EFC | <i>Enhanced Fluidity Chromatography</i> , Cromatografia com Fluidez Aumentada |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agronômica |
| EtOH | etanol |
| FDA | <i>Food and Drugs Agency</i> , Agência Americana de drogas e Alimentos |
| GC | <i>Gas Chromatography</i> , Cromatografia Gasosa |
| H | hexano |
| HD | solução de hexano:diclorometano (1:1) |
| HI | mistura das variedades de uvas Herbemont e Isabel |
| HPLC | <i>High Performace Liquid Chromatogaphy</i> , Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| IR | <i>infrared</i> , infravermelho |
| ISA | variedade da uva Isabel |
| L | ácido linoléico |
| La | ácido láurico |
| LDL | <i>low density lipoprotein</i> , lipoproteína de baixa densidade |
| LLL | trilinoleína |
| LLLn | linoleioillinolenoleoil linoleioilglicerol |
| LLnLn | linolenoilinooleoil linolenoilglicerol |
| ME | variedade da uva Merlot |
| MeOH | metanol |

| | |
|----------------|--|
| MIC | <i>Monitoring Ion Chromatogram</i> , Cromatograma Monitoramento de Íons |
| MO | variedade da uva Moscato |
| MS | Mass Spectrometry, Espectrometria De Massas |
| NaOH. | hidróxido de sódio |
| NMR | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Ressonância Magnética Nuclear |
| O | ácido oléico |
| OLL | linoleoiloleoil linoleoilglicerol |
| OOL | linoleoiloleoil oleoilglicerol |
| OOO | trioleína |
| P | palmítico |
| p.a. | puro para análise |
| Pc | pressão crítica |
| PFE | <i>pressurized fluid extraction</i> , extração com fluido pressurizado |
| PLE | <i>pressurized liquid extraction</i> , extração com líquido pressurizado |
| PLL | linoleoilpalmitoil linoleoilglicerol |
| PLLn | linolenoilpalmitoil linoleoilglicerol |
| POL | linoleoilpalmitoil oleoilglicerol |
| POP | oleoilpalmitoil palmitoilglicerol |
| PPL | linoleoilpalmitoil palmitoilglicerol |
| PPP | tripalmitina |
| r ² | fator de correlação |
| Rid | <i>Refractive Index Detector</i> , Detector de Índice De Refração |
| RNA | ácido ribonucleico |
| SCAN | varredura de espectro de massas |
| SFE | <i>Supercritical Fluid Extraction</i> , Extração com Fluido Supercrítico |
| SI | mistura das variedades Seibel e Isabel |
| SIM | <i>Single Ion Monitoring</i> , Monitoramento Seletivo de Íons |
| SMOD | solventes modificadores |
| SMOD | solvente modificador |
| split | injeção cromatográfica com divisão de fluxo |
| St | ácido esteárico |
| StLL | linoleioilestearoil linoleoilglicerol |

| | |
|----------------|--|
| StOL | linoleioiloleoil stearilglicerol |
| T _c | temperatura crítica |
| TG | triglicerídeos |
| TIC | <i>Total Ion Chromatogram</i> , Cromatograma Total de Íons |
| TMCS | trimetilclorosilano |
| TMS: | trimetil silano |
| USE | <i>Ultrasonic Extraction</i> , <i>Extração por Ultra-Som</i> |
| UV-VIS | ultravioleta visível |
| δ _c | densidade crítica |

RESUMO

A produção de óleo de semente de uva é uma alternativa de uso para o resíduo da indústria vinícola. Este material é de ótima qualidade podendo ser utilizado como matéria prima na indústria alimentícia, na de cosméticos, na farmacêutica e na indústria de tintas. Este estudo visa caracterizar e avaliar o óleo extraído por diferentes metodologias de extração, em diferentes variedades de uvas vinícolas do Rio Grande do Sul, com a intenção de propor uma utilização mais nobre deste resíduo.

Foram utilizados métodos clássicos (prensagem e Soxhlet) e não clássicos (ultra-som, líquido pressurizado e fluido supercrítico) para a extração do óleo de sementes de uvas de diferentes variedades, todas provenientes da indústria de vinhos gaúcha. O uso de diferentes processos de extração permitiu comparar e otimizar diferentes métodos para uso na indústria de óleos. Também foram usadas diferentes técnicas analíticas, como cromatografia gasosa com detector de espectrometria massas, cromatografia líquida com detector de ultra violeta e cromatografia líquida com detector de índice de refração.

A extração por prensagem foi a que produziu o menor rendimento em óleo bruto, enquanto a extração com líquido pressurizado mostrou ser o melhor método de extração para as sementes de uvas utilizadas. Porém, quando foi analisado o teor de cada composto verificou-se que a concentração de ácidos graxos totais e triglicerídeos foram semelhantes, já a concentração de ácidos graxos livres e ésteres etílicos variaram conforme a metodologia empregada. A maior diferença foi observada no teor de vitamina E, que varia conforme a variedade de sementes de uvas utilizadas e também com os métodos de extração empregados. A extração com fluido supercrítico foi o método que mais se adequou para a extração de óleos de semente de uva com elevado teor de vitamina E.

Os métodos propostos mostraram ser eficientes e capazes de extrair um óleo de boa qualidade para a utilização comercial, indicando que se pode produzir óleo das sementes de uvas gaúchas, com qualidade equivalente ao óleo importado, agregando valor a este resíduo da indústria vinícola.

ABSTRACT

The production of grape seed oil is an alternative to use the residue of the wine-producing industry. This material presents of great quality and it could be used as raw material in the food, cosmetics, pharmaceutical and paint industries. The goal of this study was to characterize and to evaluate the oil obtained by different extraction methods, using different varieties of wine-producing grapes from Rio Grande do Sul, with the intention of proposing a more noble use of this residue.

Classic (press and Soxhlet) and no classic (ultrasound, pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction) methods were used for the extraction of different varieties of grape seed oil of from the gaucho wines industry. The use of different extraction methods processes allowed to compare in the oils industry. Several analytical techniques were used, as gas chromatography with mass spectrometry detector, liquid chromatography with ultraviolet detector and liquid chromatography with refractive index detector.

The press extraction produced the smallest yield in oil, while the pressurized liquid extraction was the best extraction method for the studied grape seeds. The amount of each individual compound was determined, The concentration of total fatty acids and triglycerides were similar in both extraction procedures, while the concentration of free fatty acids and ethyl esters were different according to the used methodology.

The amount of vitamina E extracted was dependent of the variety of grape and also the extraction method employed. The supercritical fluid extraction was the best method for extraction of grape seed oil with higher quantity of vitamin E.

The proposed methods showed to be efficient and capable of extracting grape seed oil with high and higher vitamina E content than present Industrial extraction methods, indicating that it is possible to produce grape seeds oil from Rio Grande do Sul winery seeds, with equivalent quality to the imported oil, adding up value to this residue of the wine industry.

1 - INTRODUÇÃO

As uvas estão entre as frutas mais nutritivas consumidas pela humanidade, sendo aproveitadas, principalmente, a polpa e a semente. Essas são consumidas *in-natura* ou utilizadas como matéria-prima na fabricação de vinhos, sucos, geléias e passas. Seus rejeitos podem ser processados e reutilizados por outras indústrias, como a alimentícia, a cosmética, a farmacêutica e a de tintas. Como subprodutos podem ser extraídos o óleo de semente de uva, taninos, antocianinas (pigmentos) [1] e adubos [2].

Existem muitas variedades de uvas cultivadas nas regiões vinícolas do Brasil. Diferem pela forma e crescimento das cepas, disposição e pilosidade das folhas, cor, forma dos grãos, conteúdo de açúcares e, conseqüentemente, pelo sabor. As variedades brancas e tintas para a elaboração do vinho, são

denominadas uvas para prensar (vinhateiras) e as destinadas ao consumo humano direto, uvas de mesa [3].

As variedades de uvas para a elaboração dos vinhos, podem ser divididas em duas categorias principais: *Vitis vinífera*, que oferecem vinhos de qualidade superior, encorpados, de agradável *bouquet* e *Vitis lobrusca*, que proporcionam vinhos comuns [4].

A produção de uva no Brasil está localizada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Constitui-se em uma atividade consolidada, com grande importância sócio-econômica, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, que são responsáveis por 97% da produção nacional de vinhos. Cerca de 50% da produção nacional das uvas é destinada à elaboração de vinhos, sucos, destilados e outros derivados [2].

Sabendo que as indústrias de uva têm um importante papel na economia do sul do país e que seu processamento gera quantidades significativas de resíduos, o presente trabalho se propõe a estudar as sementes contidas nesses resíduos e verificar a possibilidade dessas sementes serem melhor aproveitadas para a produção de um subproduto de alto valor agregado: o óleo de semente de uva.

O óleo de semente de uva é industrializado na Europa (uvas das variedades *Vitis vinífera*) e é conhecido por ter em sua constituição um alto teor de ácidos graxos insaturados, linoléico e oléico, além de apresentar propriedades antioxidantes devido a presença da vitamina E.

No Brasil, as variedades de uvas mais cultivadas são provenientes de *Vitis lobruscas*. Existem poucos trabalhos que estudaram e diferenciaram as variedades de uvas brasileiras para a produção do óleo de semente de uva. Contudo sabe-se que os óleos, em sua maioria, são compostos de triacilgliceróis porém pouco se conhece sobre seus demais constituintes.

O trabalho desenvolvido pretende avaliar e identificar constituintes, como os ácidos graxos totais, os ácidos graxos livres, os triacilgliceróis, os compostos antioxidantes (vitamina E e compostos fenólicos) presentes no óleo extraído de variedades de uvas utilizadas na fabricação dos vinhos brasileiros.

Para este estudo realizou-se a comparação de metodologias clássicas, como extração com solvente (Soxhlet) e prensagem, com as metodologias mais sofisticadas como o ultra-som (USE – *ultrasonic extraction*), extração com líquido pressurizado (PLE – *pressurized liquid extraction*) e extração com fluido supercrítico (SFE – *supercritical fluid extraction*).

Para a identificação de compostos orgânicos voláteis, foi utilizada a cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (GC/MS) e, para a quantificação dos compostos com alto peso molecular ou termolábeis, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detectores de ultravioleta/visível e índice de refração (UV/Vis e RI).

1.1 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O **objetivo geral** deste trabalho é a caracterização do óleo de semente de uva. A partir do objetivo geral, apresentam-se os seguintes **objetivos específicos**:

- a) estabelecer ótimas condições para a extração dos componentes presentes no óleo de semente de uva, em métodos não clássicos como extração por ultra-som (USE), extração com líquido pressurizado (PLE) e extração com fluido supercrítico (SFE) utilizando solventes com diferentes polaridades;
- b) caracterizar, identificar e quantificar os principais componentes do óleo de semente de uva utilizando técnicas cromatográficas;
- c) realizar um estudo comparativo entre métodos clássicos de extração (prensagem e Soxhlet) e métodos não clássicos (ultra-som, fluido supercrítico e líquido pressurizado),
- d) comparar sementes de diferentes variedades de uvas do Rio Grande do Sul quanto ao teor e à qualidade do óleo produzido.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE O CULTIVO DA UVA

Pesquisas arqueológicas indicam que a uva já era cultivada há mais de 4000 anos AC., e que, apesar das origens das primeiras produções dos vinhos serem incertas, as civilizações vêm simplesmente aperfeiçoando. As pesquisas de Louis Pasteur sobre a fermentação no século XIX, possibilitaram o desenvolvimento da produção de uva para o grande comércio industrial [5].

A história da viti-vinicultura registra que a videira foi introduzida no Brasil em 1532, por Martin Afonso de Sousa, na Capitania de São Vicente. Durante o período colonial, foram realizadas novas introduções de variedades de uvas em diversos pontos do país [6]. Todas as variedades de uvas *Vitis viníferas*, consideradas nobres, cultivadas na época, foram originárias de Portugal, havendo referências históricas sobre: Boaes, Moscatéis, Ferraes, Bastarda, Verdelho, Galega [6].

Entre os anos de 1830 e 1850, foram trazidas para o Brasil cultivares de origem americana, pertencentes a *Vitis lobrusca* e *Vitis bourquina*, predominando o cultivo da *Vitis lobrusca* (uva Isabel). Essas videiras rústicas e bastante produtivas, difundiram-se rapidamente pelas áreas de todo país [6].

A partir da segunda metade do século XIX, a viti-vinicultura passou a ter importância comercial no Brasil, impulsionada principalmente pelas correntes imigratórias européias. Os pólos vinícolas que mais se destacaram encontravam-se localizados em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul [6].

Entre os anos de 1900 e 1950, o número de cultivares no país ampliou-se significativamente. Variedades híbridas de origem européia (portuguesas, francesas, italianas, espanholas e alemãs) começaram a chegar ao Brasil. A grande maioria das cultivares importadas permaneceram apenas em coleções, porém as uvas híbridas e viníferas, começaram a alterar a composição dos vinhedos brasileiros [6].

A maior produção de uvas no Brasil se localiza nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Constitui-se em atividade consolidada, com importância sócio-econômica, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Em 1999, o Rio Grande do Sul apresentou cerca de 58,14 % da produção de uvas do país [3], a partir do ano seguinte aproximadamente 56,13 % da produção de uvas, foram destinados à indústria de vinhos, sucos, destilados e outros derivados [3]. A partir da safra de 2001, 97 % dos vinhos produzidos no Brasil eram provenientes do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina [2].

Em 2004 a exportação desta fruta *in-natura* alcançou a marca de 37 600 toneladas. A **Tabela I** apresenta o levantamento realizado pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agronômica), no período de 2000 a 2005, onde se mostra a quantidade dos produtos exportados pelas indústrias vitivinícolas.

Tabela I: Levantamento realizado pela Embrapa sobre a quantidade dos produtos exportados pela vitivinicultura do Rio Grande do Sul

| itens | exportações | | | | | |
|--------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 |
| uvas frescas (Kg) | 14.343.500 | 20.660.404 | 26.357.025 | 37.600.734 | 28.815.315 | 51.212.801 |
| suco de uva (L) | 8.784.003 | 7.917.204 | 6.812.516 | 5.094.873 | 7.384.237 | 7.710.522 |
| vinhos de mesa (L) | 6.288.613 | 2.654.582 | 2.250.037 | 1.380.445 | 2.801.995 | 3.529.789 |
| espumantes (L) | 265.767 | 81.913 | 46.210 | 75.643 | 198.905 | 111.405 |

Fonte: Embrapa (2006) – Referência [7]

As indústrias vinícolas brasileiras utilizam principalmente a variedade Isabel (híbrida) para a fabricação de vinhos considerados comuns e as variedades Chardonay e Sauvignon, para vinhos considerados nobres. Para a fabricação de sucos, a variedade Concord, é a mais utilizada. Para traçar um perfil das uvas mais utilizadas no estado pelas indústrias vitivinicultoras, é necessário fazer a seleção das sementes que compõem, em maior quantidade, o resíduo da indústria do Rio Grande do Sul. A **Tabela II** apresenta o panorama geral das uvas processadas nas indústrias vinícolas do Rio Grande do Sul no período de 2000 a 2005.

As uvas americanas e híbridas são as variedades mais utilizadas dentro do Rio Grande do Sul para a produção de vinhos, estas representam mais de 50 % do total das uvas processadas pela indústria vinícola.

Tabela II: Quantidade de uvas (em Kg) processadas nas vinícolas do Rio Grande do Sul entre 2000 e 2005

| uvas | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| viníferas | 73.589.548 | 49.461.996 | 47.683.899 | 43.299.435 | 62.508.680 | 70.577.252 |
| americanas e híbridas | 447.345.549 | 386.292.199 | 426.590.496 | 339.909.112 | 516.389.913 | 422.637.751 |
| mesa | 615.990 | 141.673 | 124.162 | 144.024 | 122.885 | 9.390 |

Fonte: Embrapa (2006) – Referência [7]

A indústria vinícola produz um resíduo de biomassa basicamente composto por cascas, sementes e engaço (hastes de uvas) [2,3]. Das cascas de uvas podem ser extraídas as antocianidinas, utilizadas como corantes na indústria alimentícia, enquanto que das sementes, pode ser extraído o óleo de semente de uva [8,9].

Entretanto, no Brasil, este resíduo geralmente é usado para adubação do solo e complemento da ração animal [8,9]. Este fim não é o mais indicado para a adubação do solo devido à lenta biodegradabilidade das sementes de uvas, que não propicia a conversão total da matéria orgânica de uma safra para outra. A quantidade elevada de fibras torna inviável o consumo em grande escala deste resíduo para ração animal [2].

A quantidade de sementes presente na uva (fruto) pode variar entre um e quatro. Uvas com maior número de sementes apresentam maior peso, menor teor de açúcar e maior acidez. As uvas sem sementes são denominadas apirenas. As sementes representam de 2 a 5 % de peso da uva e contém cerca de 10 a 20 % de óleo comestível considerado de boa qualidade [3]. De 100 kg de resíduo úmido produzido pela indústria são obtidos de 10 a 12 kg de sementes [3].

Com o processamento de 500 000 toneladas de uvas pelas vinícolas cerca de 50 000 toneladas dos resíduos são sementes que podem ser utilizadas na formação de sub-produtos para outras indústrias. O óleo de semente de uva já é fabricado na Europa (principalmente na Alemanha, França e Itália) desde 1930 [9]. A extração deste óleo é uma alternativa econômica promissora, tendo em vista

a situação atual das empresas brasileiras que adquirem o produto por 6 dólares o quilograma.

O óleo de semente de uva é usado na Europa como óleo comestível ou como matéria prima do setor industrial. Para a indústria alimentícia o mesmo apresenta odor agradável, podendo substituir praticamente todos os óleos vegetais, inclusive o de oliva, [9]. Sua digestibilidade (97,2%) é maior do que o óleo de soja (95%) [2,3]. Sua composição química é apropriada para dietas que visam diminuir os níveis de colesterol no sangue devido ao alto teor de ácidos graxos insaturados e fitosteróis [3].

Na indústria de cosméticos, o óleo é empregado na fabricação de sabonetes finos, sabões e no preparo de emulsões (loções, cremes, óleos bronzeadores e xampus). Esse óleo pode substituir com vantagens o óleo de amêndoas no processo de tratamento de estrias nas gestantes devido à presença de vitamina E e compostos fenólicos [2,9].

Na indústria farmacêutica, desempenha papel importante na elaboração de medicamentos para uso interno que exijam a presença de um óleo natural como veículo. Como exemplo, no uso da vitamina D₂, em que ele atua com o poder anti-oxidante protegendo a vitamina de uma possível degradação [2,9].

Na indústria de tintas, o óleo de semente de uva é empregado como secante [9].

2.2 CARACTERÍSTICAS DE ÓLEOS E GORDURAS VEGETAIS

A partir da década de setenta houve um aumento significativo na produção mundial de sementes para óleos, acarretando uma demanda de produtos e subprodutos obtidos dessas sementes [3].

Uma das principais utilizações desses óleos está na indústria alimentícia, onde podem ser ingeridos crus ou cozidos, servindo como meio de transferência de calor em frituras, fonte de calorias e de vitaminas lipossolúveis [3,10].

As gorduras (sólidos) e óleos (líquidos) são ésteres formados a partir de ácidos graxos superiores (C₁₂-C₂₀) ligados ao glicerol. Estes ésteres são

freqüentemente chamados de glicerídeos, que contêm ácidos graxos ao acaso em torno das moléculas de glicerol [11,12]. Dentre os ácidos graxos saturados mais importantes obtidos pela hidrólise de gorduras e óleos encontram-se o láurico, palmítico e esteárico. Dos ácidos graxos insaturados, os mais importantes são os ácidos oléico, linoléico e linolênico [11,12].

No Brasil, os principais óleos e gorduras vegetais são extraídos da soja, amendoim, algodão, babaçu, dendê e oliva, sendo produzidos em quantidades suficientes para suprir as necessidades de consumo interno, com exceção do óleo de oliva [10].

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), considerando a necessidade de maior controle sanitário dos alimentos, fixou as características mínimas para assegurar a qualidade dos óleos e gorduras vegetais, baseada no teor dos principais constituintes dos óleos, que são os ácidos graxos [3]. A **Tabela III** apresenta os principais ácidos graxos presentes nos óleos comercializados:

Tabela III: Principais ácidos graxos dos óleos vegetais, segundo a ANVISA [13].

| carbono | ácidos | g/100g de óleo | | | | |
|--------------|------------------|----------------|--------------|--------------|---------------|----------------|
| | | soja | girassol | arroz | oliva | semente de uva |
| C12:0 | láurico | - | - | - | - | <0,5 |
| C14:0 | mirístico | <0,1 | <0,5 | 04-1,0 | 0,05 | <0,3 |
| C16:0 | palmítico | 7-14 | 3-10 | 12-18 | 7,5-20 | 5,5-11 |
| C16:1 | palmitoléico | <0,5 | <1 | 0,2-0,4 | 0,3-3,5 | <1,2 |
| C18:0 | esteárico | 1,4-5, 5 | 1-10 | 1,0-3 | 0,5-5 | 3-6 |
| C18:1 | oléico | 19-30 | 14-35 | 40-50 | 55-83 | 12-28 |
| C18:2 | linoléico | 44-62 | 55-75 | 29-42 | 3,5-21 | 58-78 |
| C18:3 | linolênico | 4-11 | <0,3 | <1 | 0,9 | <1 |
| C20:0 | araquídico | <1 | <1,5 | <1 | 0,6 | <1 |
| C24:0 | lignocérico | - | <0,5 | - | 0,2 | <0,1 |

Segundo a composição apresentadas pela ANVISA o óleo de semente de uva tem características semelhantes ao óleo de girassol, sendo que ácidos graxos insaturados (linoléico e oléico) corresponde a maior concentração dos analitos na amostra. A grande vantagem em relação ao óleo de girassol e a outros óleos vegetais se deve ao fato de que a matéria prima é proveniente do resíduo industrial mal aproveitado.

2.3 MÉTODOS EMPREGADOS NA EXTRAÇÃO DE ÓLEOS

2.3.1 MÉTODOS CLÁSSICOS DE EXTRAÇÃO

Os métodos tradicionais para extração dos óleos a partir de sementes são a prensagem e a extração com solvente (Soxhlet) ou a combinação de ambos [12,14]. A extração por prensa mecânica realiza o esmagamento das sementes removendo parcialmente o óleo [14].

O processo para a obtenção do óleo de sementes de uva por prensagem passa pelas seguintes fases [17]:

1. as semente são submetidas a secagem para evitar a rancificação, em um secador horizontal, tubular, que reduz o teor de umidade de 45% para 10%;
2. a semente é previamente pulverizada e aquecida com o vapor e, posteriormente, extraída por prensagem mecânica;
3. o óleo bruto é refinado e neutralizado; em seguida é secado a vácuo e filtrado com terra diatomácea;
4. finalmente o óleo filtrado é submetido a baixa temperatura, durante 48 horas (para separar os últimos traços de ceras e gomas). O óleo, após passar por este processo de desodorização, está pronto para ser comercializado.

Esta metodologia descrita por Basile [17], corresponde basicamente à metodologia empregada na produção de outros óleos vegetais já comercializados em larga escala. Com isso, poderão ser aproveitadas plantas industriais já estabelecidas, para a extração do óleo de semente de uva no período de safra.

Nas prensagens, a torta retém por absorção, quantidades apreciáveis de óleo, que podem atingir de 4 a 7% de seu peso. Esta torta pode ser reaproveitada para processamento de farinha para ração de animais [3,14].

Na extração de óleos vegetais com solvente (Soxhlet), as sementes são extraídas com solventes apolares com ponto de ebulição até 70°C [14]. O aumento desta temperatura pode ser responsável pela formação de ácidos graxos livres, devido a quebra de ligações entre ácidos graxos e o glicerol. A extração em Soxhlet é realizada geralmente com hexano, durante 20 horas [15].

A extração de sementes de uva por Soxhlet obtém de 10 a 20% de rendimento de óleo extraído [3]. No trabalho de Kamel e Daawson [16], que utilizou sementes de uvas das variedades Sweet Emperor e Sweet Ribier, o rendimento encontrado de óleo foi de 14% [16].

2.3.2 EXTRAÇÃO COM ULTRA SOM

O ultra-som não é comumente usado para extração de óleos vegetais, entretanto já existem relatos na literatura de seu uso [18]. Inicialmente o ultra-som foi utilizado para limpeza de materiais, mas devido às suas propriedades, começou a ser aplicado para homogeneização de soluções, limpeza, esterilização, desgaseificação e extração de plantas [19 - 21].

As ondas ultra-sonoras de alta potência produzidas no banho de ultra-som causam mudanças físicas e químicas devidas à variação de pressão, produzindo cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás [19,22].

Breitbach e colaboradores [24] estudaram os fatores que influenciam na adsorção e dessorção durante o processo de caviatação na extração com ultra-som e concluíram que os principais fatores que interferem na cavitação são: a intensidade e a frequência produzidas pelo ultra-som. Dependendo desses fatores a produção de bolhas pode ocorrer com tamanhos diferentes, podendo provocar maior erosão na superfície dos sólidos, assim como acelerar o aquecimento e transporte de massas, fazendo com que o método seja mais ou menos eficiente.

As vantagens do ultra-som estão na simplicidade do equipamento, na economia do custo inicial, na possibilidade de usar diferentes solventes para a extração, bem como diminuir o tempo necessário para realizá-las, além de apresentar uma boa reprodutibilidade. Todavia, como é reportado na literatura, a extração com ultra-som depende da intensidade da cavitação, tempo de extração e temperatura, sendo necessário otimizar estes parâmetros para a utilização desta técnica [18,19,23-25].

Entre os trabalhos sobre a utilização o ultra-som para a extração de lipídeos está o de Ametaj e colaboradores [23] que avaliaram os efeitos do equipamento na preparação da amostra para extrair lipídeos de fígado bovino. Nesse trabalho constataram que a extração com ultra-som não interfere no rendimento dos lipídeos extraídos quando aplicados tempos diferentes, mas a precisão (coeficiente de variação) da extração é afetada.

2.3.3 EXTRAÇÃO COM LIQUIDO PRESSURIZADO (PLE)

O uso da PLE (*Pressurized Liquid Extraction*) também conhecido como ASE (*Accelerated Solvent Extraction*) ou PFE (*Pressurized Fluid Extraction*) foi primeiramente descrito em 1995 [26]. Este método de extração utiliza temperatura e pressão para influenciar na eficiência do processo. A temperatura pode ser utilizada acima do ponto de ebulição do solvente, porém a pressão dentro da célula deverá ser suficientemente elevada para manter o solvente no estado líquido [26 - 28].

O acréscimo de temperatura aumenta a solubilidade e a difusão dos analitos, enfraquece e/ou rompe as interações dos analitos com a matriz e diminui a viscosidade e a tensão superficial do solvente, fazendo com que haja uma maior penetração nos poros da matriz [26,28,29]. Todos os solventes podem ser usados na PLE, exceto quando eles atingem seu ponto de auto-ignição [26].

Moreau e colaboradores [30] descrevem a PLE de lipídeos polares e apolares no milho, usando como solventes hexano, diclorometano, isopropanol e etanol. Afirmam estes autores que aumentando a temperatura e a polaridade do solvente, aumenta o rendimento da extração [30].

Toschi e colaboradores extraíram lipídeos de carnes de aves com a PLE e compararam seus resultados com o método tradicional (Folch), encontraram resultados equivalentes para a extração de ésteres metílicos nos dois processos.[31].

Embora já se tenha relatos de trabalhos com extração de óleos vegetais por PLE, não há registros, até o presente momento, desta ferramenta para a extração do óleo de semente de uva. Estudos obtidos com PLE mostram que as variáveis aplicadas ao processo de extração podem afetar o rendimento e as características do óleo [32].

2.3.4 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE)

Quando uma substância está sujeita a temperaturas e pressões acima do seu ponto crítico, um gás altamente comprimido, conhecido como fluido supercrítico, se forma. As extrações com fluidos supercríticos são muito rápidas, pois apresentam boa transferência de massa em função da baixa viscosidade e alta difusibilidade do fluido supercrítico. Outra característica importante é que o poder solvatante pode ser controlado em função da pressão e temperatura. Com pequenas alterações destes parâmetros, podem ocorrer grandes mudanças no poder solvente, conduzindo a extrações mais seletivas [33-35].

A temperatura crítica de um gás é aquela temperatura acima da qual ele não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se eleve a pressão aplicada. Por outro lado, sua pressão crítica é definida como a pressão acima da qual o gás não pode mais ser liquefeito, não importando a quanto se diminua a temperatura. É um estado intermediário da substância, isto é, entre o líquido e o gasoso (**Figura 1**). Nessas condições, ela é relativamente densa se comparada a um gás convencional e suas forças de solubilização são mais intensas.

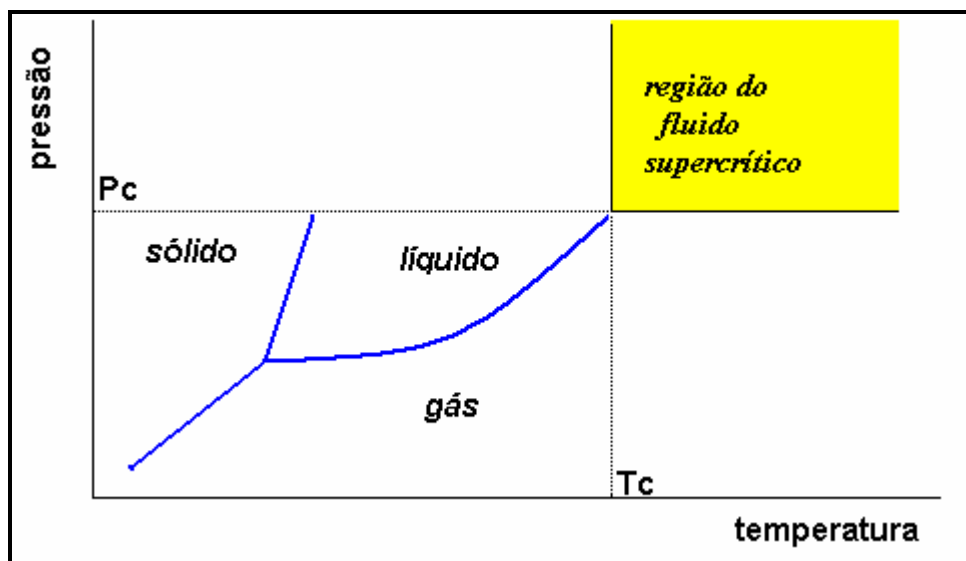


Figura 1: Diagrama genérico de fases de uma substância

Os fluidos supercríticos trazem consigo algumas propriedades dos gases e dos líquidos:

1. compressibilidade semelhante à de um gás, com este preenchendo completa e uniformemente o recipiente;
2. dissolução de solutos — como um líquido — quando suficientemente comprimidos;
3. viscosidade baixa como a de um gás, produzindo pequenas quedas de pressão em colunas de mercúrio;

Apesar de usualmente definido a partir de diagramas de fases, onde o fluido supercrítico é conceituado como uma região física encontrada acima do ponto crítico da substância, este conceito tem pouca importância prática, uma vez que a passagem do estado gasoso ou líquido para o supercrítico ocorre de uma forma contínua e não de modo descontínuo, como sugerido por estes diagramas [36].

O princípio de extração com fluido supercrítico aproveita as propriedades físicas dos fluidos no estado supercrítico. Como a densidade de um fluido supercrítico é de 100 a 1000 vezes maior que a de um gás, comparável à de um líquido, as interações moleculares nele podem ser fortes, permitindo diminuir suas distâncias intermoleculares [37] oferecendo, portanto, maior capacidade de

solvatação para várias substâncias químicas. Por conta da semelhança entre a viscosidade dos fluidos supercríticos e a dos gases, e por seu coeficiente de difusão ser maior que o dos líquidos, a extração das substâncias, mediante este processo, é muito facilitada.

O desenvolvimento de equipamentos comerciais, de pesquisa e mesmo acadêmicas, envolvendo a extração com fluido supercríticos, têm crescido continuamente. Como exemplos comerciais, podem ser citados: a indústria da cerveja, a extração de princípios amargos e aromáticos do lúpulo [38-40]; a descafeinação do café [41,42]; a obtenção comercial de carotenos da cenoura [43]; a produção de bases para cosméticos a partir do resíduo das cervejarias [44,45]; a extração de óleos essenciais de plantas [40,46-48]; a retificação e desodorização de óleos comestíveis em geral [49]; e, para a indústria farmacêutica, a extração de matérias-primas das plantas medicinais [38, 47,50-52]. Na **Tabela IV** apresenta-se um resumo da literatura com os principais estudos envolvendo aplicações dos processos de SFE em óleos.

Tabela IV: Aplicações dos processos de SFE em óleos

| matéria prima | objetivo do estudo | ref. |
|---|--|-------------|
| azeite de oliva | ácidos graxos | [53] |
| cardamomo | óleo de cardamomo | [46] |
| soja | óleo de soja | [49] |
| soja e girassol | extração com óleo de soja e girassol | [54] |
| atum | extração do óleo de atum | [55] |
| soja | extração e hidrogenação do óleo de soja | [56] |
| <i>Borago officinalis</i> l. | análise dos parâmetros de umidade, fluxo e temperatura para a extração do óleo de borago | [57] |
| semente de aipo | extração do óleo de aipo | [58] |
| óleo de soja e de castanha do Pará | extração de ácidos graxos livres de óleos | [59] |
| óleo de soja | concentração de tocoferóis | [60]. |
| semente de uva (variedade Chardonnay) | extração e fracionamento do óleo de semente de uva | [61] |
| semente de uva (variedade Airen) | rendimento do óleo de semente de uva extraída com CO ₂ (6,9%) | [15] |
| semente de uva | extração do óleo de semente de uva com CO ₂ (72,50%) | [62] |
| semente de uva (variedades Barbera, Gamay, Malbec, Pinot Noir, Merlot, Syrah, Cabernet) | extração do óleo de semente de uva com CO ₂ (5,85 – 13,6%) | [63] |

2.3.4.1 SOLVENTES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO.

Existe uma ampla variedade de compostos que podem ser usados como fluidos supercríticos. Na **Tabela V** estão apresentados alguns fluidos que podem ser utilizados na extração com fluidos supercríticos, juntamente com os parâmetros críticos P_c (pressão crítica), T_c (temperatura crítica), ρ_c (densidade crítica) [64].

Tabela V: Solventes mais utilizados na extração supercrítica

| fluidos | T_c ($^{\circ}\text{C}$) | P_c (atm) | ρ_c (g/cm ³) |
|---|------------------------------|--------------|-------------------------------|
| CO₂ | 31 | 72,85 | 0,469 |
| NH ₃ | 133 | 111,54 | 0,236 |
| água | 374 | 217,17 | 0,323 |
| N ₂ O | 36 | 71,50 | 0,452 |
| metano | - 82 | 45, 41 | 0,169 |
| etano | 32 | 48, 17 | 0,203 |
| propano | 97 | 41,85 | 0,217 |
| pentano | 197 | 33,26 | 0,237 |
| etileno | 9 | 49,65 | 0,218 |
| tolueno | 319 | 40,57 | 0,292 |
| metanol | 240 | 79,86 | 0,272 |
| etanol | 241 | 60,61 | 0,276 |
| acetona | 235 | 46,39 | 0,279 |
| éter etílico | 194 | 35,93 | 0,265 |
| <i>T_c</i> = temperatura crítica; <i>P_c</i> = pressão crítica; ρ_c = densidade crítica [64] | | | |

De todos os fluidos possíveis, o CO₂ é o mais usado por apresentar pressão crítica moderada e baixa temperatura crítica, ideal para muitos compostos termolábeis. Além disso, é facilmente separado do soluto, não é tóxico, não causa problemas ambientais, não é inflamável e é barato [64].

O CO₂ supercrítico tem densidade próxima à de um líquido, baixa viscosidade, e se difunde como um gás, o que lhe confere excelentes qualidades de extração. É o solvente indicado para a extração de uma grande faixa de substratos naturais. Sua seletividade de extração pode ser ajustada para cada substrato, mudando-se a temperatura e a pressão dentro da região supercrítica [65].

O CO₂, apolar, em condições normais de temperatura e pressão, apresenta, sob elevadas pressões, constante dielétrica equivalente a de substâncias que são polares em condições normais de temperatura e pressão; por outro lado, a água, considerada uma substância altamente polar em condições

normais de temperatura e pressão, mostra constante dielétrica próxima de zero quando submetida a elevadas temperaturas e pressões [65].

Outras características, que o CO₂ também possui, são desejadas quando se escolhe o fluido para ser utilizado na extração, como:

- ✓ possibilidade de fracionamento de substâncias que apresentem diferenças na volatilidade, no peso molecular ou na pressão de vapor;
- ✓ versatilidade, os parâmetros de extração do dióxido de carbono supercrítico podem ser modificados facilmente pela adição de pequenas quantidades de outros produtos, chamados de solventes modificadores, polares ou apolares, como o hexano, a água e o etanol, e também pela seleção das condições de temperatura e pressão específicas, opções estas que adicionam flexibilidade ao processo e permitem a adequação das condições de extração às necessidades específicas dos produtos a serem extraídos e ao produto final desejado.

As indicações gerais de extração, com dióxido de carbono supercrítico são [38]:

- ✓ compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos, éteres, ésteres, cetonas e aldeídos;
- ✓ substâncias polares como açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, fosfatídios, glicosídeos e sais orgânicos, não são solúveis, apresentando algumas limitações para a extração.

Outros gases que também apresentam, em seu estado supercrítico, interessantes propriedades solventes são utilizados para a extração de plantas e outros materiais. Entretanto, por razões de custo, perigo de explosão, toxicidade, inflamabilidade e propriedades físicas adversas, poucos deles são usados comercialmente [38].

Dentre os outros gases utilizados pode ser citado o propano, que embora não apresente todas as qualidades do CO₂, é melhor solvente para muitas substâncias, presentes em óleos e produtos naturais. Este gás apresenta baixa temperatura e pressão crítica. Por isso, já existem estudos que comparam o CO₂ e o propano como solvente para a SFE [66-68].

Illés e colaboradores [68] apontam que o poder de solvatação do propano é muito mais alto que do CO₂ na extração de óleos de sementes de *Coriandrum sativum* L.

Do ponto de vista econômico, trabalhar com baixas pressões e baixas temperaturas, é de grande interesse para reduzir o custo na extração. Ao obter um maior rendimento em menor tempo e, conseqüentemente, com menor consumo de solvente, consegue-se uma ótima condição de extração [68,69].

Em estudos como o de Lanza [70], que investigou o comportamento de fases em alta pressão em óleos de soja e mamona nos solventes comprimidos (butano e propano), verificou-se que utilizando esses solventes há uma ótima miscibilidade dos óleos em baixas temperaturas e pressões.

2.3.4.2 INTERAÇÃO DE SOLVENTES MODIFICADORES PARA FLUIDO SUPERCRÍTICO

Uma prática comum é adicionar modificadores químicos (chamados também de co-solventes) para aumentar a solubilidade dos solutos ou a seletividade dos compostos extraídos nos fluídos supercríticos[71].

A adição de pequena quantidade de solvente modificador pode ter efeitos drásticos no comportamento das fases da mistura, especialmente em interações específicas entre um solvente modificador e um ou mais solutos existentes [72,73]. O poder de extração na região supercrítica é dado pela pressão e temperatura, estes parâmetros são responsáveis pela densidade e solubilidade dos solventes supercríticos. A solubilidade é um dos parâmetros que aumenta com a adição de pequenas quantidades de solventes modificadores [73,74].

Segundo a literatura, as substâncias polares apresentam baixa solubilidade em CO₂ supercrítico. Entretanto, se pequenas quantidades de solventes modificadores forem adicionadas ao CO₂, a solubilidade de compostos polares aumenta. Os co-solventes podem ser selecionados de acordo com a força de interação do soluto - solvente, quanto maior esta interação, maior a facilidade de extração. Metanol e etanol são muito utilizados como co-solventes. Eles são capazes de interagir com fenóis fazendo pontes de hidrogênio e interações dipolo-

dipolo [75]. A **Tabela VI** apresenta exemplos de extrações utilizando co-solvente com CO₂:

Tabela VI: Exemplo de extrações com CO₂ supercrítico utilizando co-solventes

| co-solvente | analitos | ref. |
|---------------------|------------------------|------|
| metanol | ácido 2-aminobenzoico | [74] |
| etanol | fosfolipideos | [76] |
| etanol | ácidos graxos | [62] |
| tri-n-butil-fosfato | hidroquinonas | [72] |
| etanol | polifenóis e taninos | [77] |
| etanol | compostos fenólicos | [78] |
| éter de petróleo | óleo de semente de uva | [63] |
| etanol | óleo de semente de uva | [75] |

Um solvente pode atuar como solvente modificador quando uma pequena proporção deste é adicionada ao solvente principal. No trabalho de Illés e colaboradores [69,79] o uso de propano como solvente modificador (adição de pequenas proporções) em CO₂ foi suficiente para uma completa recuperação na extração de óleos.

2.3.4.3 EXTRAÇÃO DE SÓLIDOS COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

Amostras sólidas devem ser trituradas ou moídas para facilitar a extração. Esse material é então colocado dentro do cilindro extrator. Assim que o dióxido de carbono passa através das matérias-primas, os aromas, os óleos e os demais compostos existentes na amostra são dissolvidos e extraídos até um nível de solubilidade de equilíbrio. A solução gasosa sai do extrator e passa através da válvula redutora de pressão; a pressão (e a força de solubilização) do CO₂ é reduzida, causando a precipitação dos componentes no separador; os aromas, óleos e demais compostos existentes na amostra são separados do dióxido de

carbono, então reciclado pelo compressor, continuando o ciclo até que todos os componentes sejam extraídos e coletados. A quantidade do gás, o fluxo, a temperatura, a pressão e o número de ciclos de extração são selecionados e calculados para otimizar a extração, dependendo do produto e dos componentes que se queiram extrair. Devido à diversidade de parâmetros possíveis, uma grande variedade de matérias-primas sólidas pode ser efetivamente extraída por esse processo [47].

2.3.5 COMENTÁRIOS SOBRE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os trabalhos analíticos envolvendo a extração de óleos dos últimos anos têm se dedicado ao estudo de novas técnicas de extração e à comparação destas com técnicas tradicionais (Soxhlet e prensagem).

As técnicas para a extração de componentes ativos de substratos naturais evoluíram consideravelmente [80]. Nos últimos anos, o processo de extração de matérias primas por diversos solventes — n-hexano, benzeno, álcoois metílico, etílico e propílico, acetona, pentano e diversos solventes clorados — passou a ser muito usado. Após a extração, o solvente é removido por evaporação ou destilação à pressão reduzida, deixando, como resultado, um extrato denso e resinoso. Os processos de remoção dos solventes apresentam um grande dispêndio de energia e custos, além de todo o problema que o solvente residual pode causar alterando as propriedades do extrato e provocando efeitos tóxicos nos consumidores.

Vários processos de extração de óleos podem produzir produtos de grande qualidade. Entretanto, quanto maior for a temperatura de extração e o uso de solventes orgânicos, maior será o risco de perda da qualidade original da matéria prima. Existem dois problemas associados à temperatura: primeiro, os danos causados aos componentes altamente sensíveis (como aromas, fragrâncias e princípios ativos farmacêuticos) e segundo, a perda de componentes altamente voláteis, de baixo peso molecular, que não podem mais ser recuperados e reincorporados aos extratos [38,80].

A extração de matérias primas naturais com dióxido de carbono supercrítico resolve eficazmente as questões associadas às altas temperaturas e ao uso de solventes orgânicos [81], pois este processo emprega temperaturas baixas e o solvente usado, dissipa-se totalmente no final da extração, após a descompressão, sendo um componente do ar atmosférico.

O estado de fluido supercrítico é apenas uma das possibilidades situadas entre os dois extremos: gases e líquidos. Se a pressão e a temperatura forem superiores à temperatura e à pressão críticas, a substância é dita no estado supercrítico. Caso esteja, pelo menos uma delas, abaixo destes valores, diz-se que a substância encontra-se no estado sub-crítico. Esta condição (a substância situada entre o estado líquido e o supercrítico) tem sido utilizada em várias técnicas instrumentais modernas, incluindo-se aí, dentre outras possibilidades, a extração subcrítica e a cromatografia subcrítica; a extração com líquido pressurizado (PLE, de *Pressurized Liquid Extraction*) e a cromatografia com fluidez aumentada (EFC, de *Enhanced Fluidity Chromatography*) [36].

Além da comparação, em termos de rendimento, com métodos clássicos, outros estudos preferem comparar métodos com algumas características afins, como a técnica de SFE e a de PLE que utilizam a variação da pressão e temperatura como agentes para aumentar a eficiência das extrações. Alguns trabalhos que comparam metodologias analíticas diferentes para análise de uma mesma matriz, são reportados na **Tabela VII**:

Tabela VII: Comparação de metodologias analíticas.

| matriz | metodologias/resultados | ref. |
|-----------------------------|---|-------------|
| madeira de cedro | SFE Sub-crítico (25°C/6000 psi): 3,64 % e SFE Supercrítico (100°C/6000 psi): 3,88%. | [82] |
| sementes de uva | Soxhlet com rendimento 50 % maior do que usando prensa. | [3] |
| sementes de soja e girassol | SFE, Soxhlet e PLE: SFE melhor para girassol enquanto Soxhlet e a PLE foram melhores para a soja. | [83] |
| sementes de uva | Rendimentos: Soxhlet (7,5 %) e SFE (6,9 %). | [15] |

2.4 COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS

Os triacilgliceróis são, notadamente, os constituintes majoritários dos óleos vegetais. Os constituintes minoritários dos óleos são os monoglicerídeos e diglicerídeos, ácidos graxos livres, fosfatídeos, esteróis, álcoois, vitaminas e outras substâncias ainda não identificadas [84].

Os estudos sobre caracterização do óleo de semente de uvas brasileiras (*Vitis lobrusca*) são escassos, por isso é necessária maior pesquisa nesta área para que este produto seja oferecido ao mercado.

2.4.1 GLICERÍDEOS E ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos podem ser encontrados na forma livre ou esterificados com o glicerol, formando os glicerídeos. Dividem-se em saturados, os que não apresentam ligações duplas, e insaturados, os que apresentam ligações duplas entre carbonos. Dentre a família dos ácidos graxos insaturados, os mais importantes são o linoléico (C18:2), linolênico (C18:3) e o araquidônico (C20:4). O organismo humano não consegue sintetizar esses ácidos graxos, que por esta razão são ditos essenciais. Na semente de uva, o ácido graxo mais abundante é o ácido linoléico, também conhecido como ω -6. Sua concentração é em torno de 70%. Os ácidos graxos linolênico e o araquidônico são encontrados em baixas concentrações, menores que 1% [14].

Os trabalhos que reportam a composição do óleo de semente de uva têm como principal enfoque a concentração de ácidos graxos ligados ao glicerol presentes nessa matriz. Segundo Kamel e Dawson [16], que utilizaram em seus estudos uvas *Vitis vinífera* (variedades Sweet Emperor e Sweet Ribier), o óleo extraído em Soxhlet, segundo as normas da AOAC (*American Oil Chemist's Society*), apresentou em torno de 72,2% de ácido linoléico, 15,6% de ácido oléico e 0,24% de ácido linolênico.

Gomes e colaboradores [15], utilizando a técnica de SFE, obtiveram em sementes de uva da variedade *Airen*, até 67% de ácido linoléico, 27% de oléico e

em torno de 0,35% de linolênico. Resultados idênticos foram obtidos com Soxhlet nesse mesmo trabalho.

Em outros trabalhos que analisam o óleo de semente de uva foram determinadas concentrações de ácido linoléico de cerca de 70%, de ácido oléico 25% e para o ácido linolênico, quantidades inferiores a 1% [62,63,85].

A rancificação dos óleos considerada como um dos problemas mais sérios da indústria alimentícia, esta rancificação pode provir da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados. A presença de antioxidantes naturais reduz este efeito [86,87].

A análise de ácidos graxos livres presentes em óleos crus é usada para caracterizar os óleos prensados de alta qualidade, como os óleos de oliva extra - virgem e para estudos de peixes e óleos marinhos que contenham ácidos graxos ω - 3 (linolênico) e ω - 6 (linoléico) benéficos à saúde. Em óleos refinados, o conteúdo de ácidos graxos livres é avaliado quando ocorre a otimização de processo físico alcalino [88].

Os ácidos graxos livres também servem como parâmetros para o controle do processo de degradação dos óleos na estocagem em diferentes condições de temperatura, oxigenação e luz e na degradação de óleos para cozinhar ou fritar [88].

O método padrão para a determinação de ácidos graxos livres em óleos é um procedimento titulométrico. Como alternativa, técnicas de extração e análise devem ser propostas para quantificar e qualificar a composição de ácidos graxos, juntamente com a valorização de outras classes de lipídeos, e, em muitos casos, sem a necessidade de derivatizar os ácidos graxos livres [88].

2.4.2 FITOSTERÓIS EM ÓLEOS VEGETAIS

Os fitosteróis (considerados como impressão digital de um óleo vegetal) são responsáveis pela idoneidade do óleo vegetal e se apresentam em baixas concentrações. Sua estrutura básica e suas principais ramificações estão representadas na **Figura 2**.

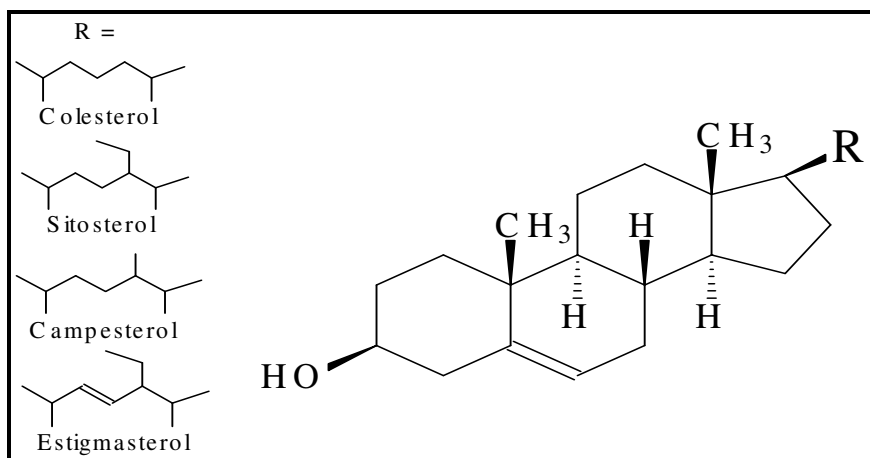


Figura 2: Estrutura básica dos fitosteróis e as diferentes ramificações.

Os fitosteróis são moléculas químicas definidas como álcoois triterpênicos, alifáticos de alto peso molecular e estão presentes na fração insaponificável dos óleos vegetais [89]. Os mais comuns encontrados em óleos vegetais são o campesterol, sitosterol, sitostanol, brassicasterol e o estigmasterol [89,90]. São conhecidos por reduzir a absorção do colesterol quando incluídos na dieta humana. Outros benefícios à saúde também são reportados em estudos, como a atividade antiinflamatória e antitumoral [91,92].

Os esteróis de fonte vegetal são coletivamente designados fitosteróis e variam em quantidade e qualidade conforme a origem do óleo [14]. O colesterol (esterol) geralmente presente na gordura animal é encontrado apenas em níveis de traços.

É importante salientar que os fitosteróis se oxidam facilmente quando expostos ao ar, e quando submetidos ao aquecimento, a luz, as radiações ou aos processos catalíticos [92].

Nos processos industriais de produção de óleos vegetais alimentícios, os óleos passam por etapas de refinamento que compreendem: degomagem, neutralização, branqueamento desodorificação e fracionamento. Esses processos podem causar a isomerização e desidratação dos fitosteróis como o sitosterol, campesterol e estigmasterol, causando assim a formação de hidrocarbonetos esteroidais e ésteres, prejudicando a qualidade do óleo. As variáveis de cada

etapa do processamento do óleo e a intensidade do tratamento dependem do óleo a ser tratado [93,94].

2.4.3 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES PRESENTES EM ÓLEOS VEGETAIS

2.4.3.1 VITAMINA E

A família da vitamina E é composta de tocoferóis e tocotrienóis (α , β , γ , δ). [87,95-97]. Cada uma destas formas tem diferente potencial biológico. O α -tocoferol é considerado o mais importante. Os tocotrienóis são encontrados em menor quantidade nas plantas e suas funções ainda não estão bem elucidadas [98].

Estudos indicam que o aumento de tocoferóis na alimentação diminui o risco do aparecimento de doenças no coração [87,97]. O α -tocoferol exerce função importante como inibir a oxidação dos radicais livres, reagindo com o oxigênio e impossibilitando a transformação dos ácidos graxos insaturados em aldeídos [87,96,99].

Os compostos da família da vitamina E oferecem benefícios à saúde humana, tendo como função essencial o transporte de elétrons para dentro das mitocôndrias no sistema fisiológico [95]. Atuam como antioxidantes lipossolúveis, protegendo as membranas celulares de radicais e espécies mutagênicas. Os radicais livres são responsáveis por vários processos patológicos, como câncer, arteriosclerose e perda celular causando o envelhecimento. É importante o consumo de alimentos que contenham antioxidantes para a proteção contra processos degenerativos [87,100].

Em estudos recentes, a vitamina E tem sido considerada como “gene regulador” devido a sua atuação na proteína do RNA. Esta vitamina atua também como imunoprotetor, anticoagulante, redutora da oxidação LDL (*low density lipoprotein*) e antitrombose [87,95].

A vitamina E é um componente básico do óleo de semente de uva que o torna resistente à degradação oxidativa [3,9,17,63]. Geralmente é consumida na

alimentação através da ingestão de óleos vegetais, que contém em média 70-1900 mg de tocoferóis por quilograma de óleo [87].

Os estudos realizados em extrações de vitamina E com óleo de diferentes variedades de semente de uva, apresentam diferentes concentrações conforme mostra a **Tabela VIII**.

Tabela VIII: Teores de vitamina E encontrados em óleo de diferentes variedades de sementes de uva através de diferentes processos de extração

| sementes | extração | vit. E (*) | ref. |
|---|---|-------------|-------|
| Isabel e Concord | prensagem | 25,4 | [17] |
| Merlot | prensagem e extração com éter de petróleo | 1 a 6 | [101] |
| Barbera, Malbec, Gamay, Cabernet Sauvignon, Pino Noir, Merlot, Cabernet Franc e Syrah | SFE c/ CO ₂ e éter de petróleo | 3,58 a 30,9 | [63] |
| Não citou a variedade | injeção direta | 12,1 | [87] |

(*) mg de vitamina E / 100g de óleo

Através da revisão da literatura, pode-se perceber que estudos sobre a vitamina E presente nas sementes de uvas brasileiras ainda são escassos.

2.4.3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos se subdividem em várias classes que compreendem cerca de 400 flavonóides que são provenientes do metabolismo secundários de plantas, derivados da condensação do ácido cinâmico com três grupos malonil - coenzima A [102]. A **Figura 3** representa a estrutura geral dos flavonóides. Na constituição da semente de uva existem vários flavonóides com natureza fenólica: monomérica, dímeras, trímeras e poliméricas (procianidinas), além dos ácidos fenólicos [102,103].

Compostos fenólicos de interesse biológico, como as proantocianidinas, também conhecidas como taninos, são encontrados nas sementes de uvas. Esses compostos apresentam como principais atividades farmacológicas a ação antimicrobiana, a prevenção do estresse oxidativo celular, o combate aos radicais

livres e os efeitos antitumoral e cardioprotetor [2,102,103], assim como atividade antiviral e prevenção da arteroesclerose [103].

A **Figura 4** apresenta os principais compostos fenólicos presentes em cascas e sementes de uvas:

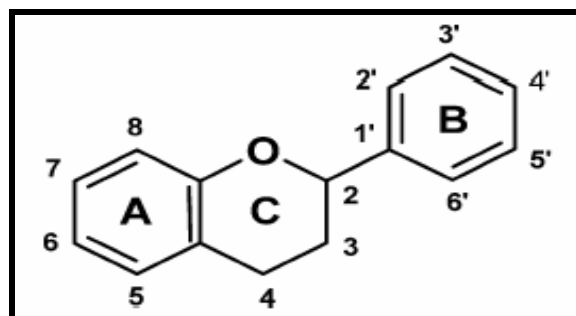


Figura 3: Estrutura básica dos flavonóides

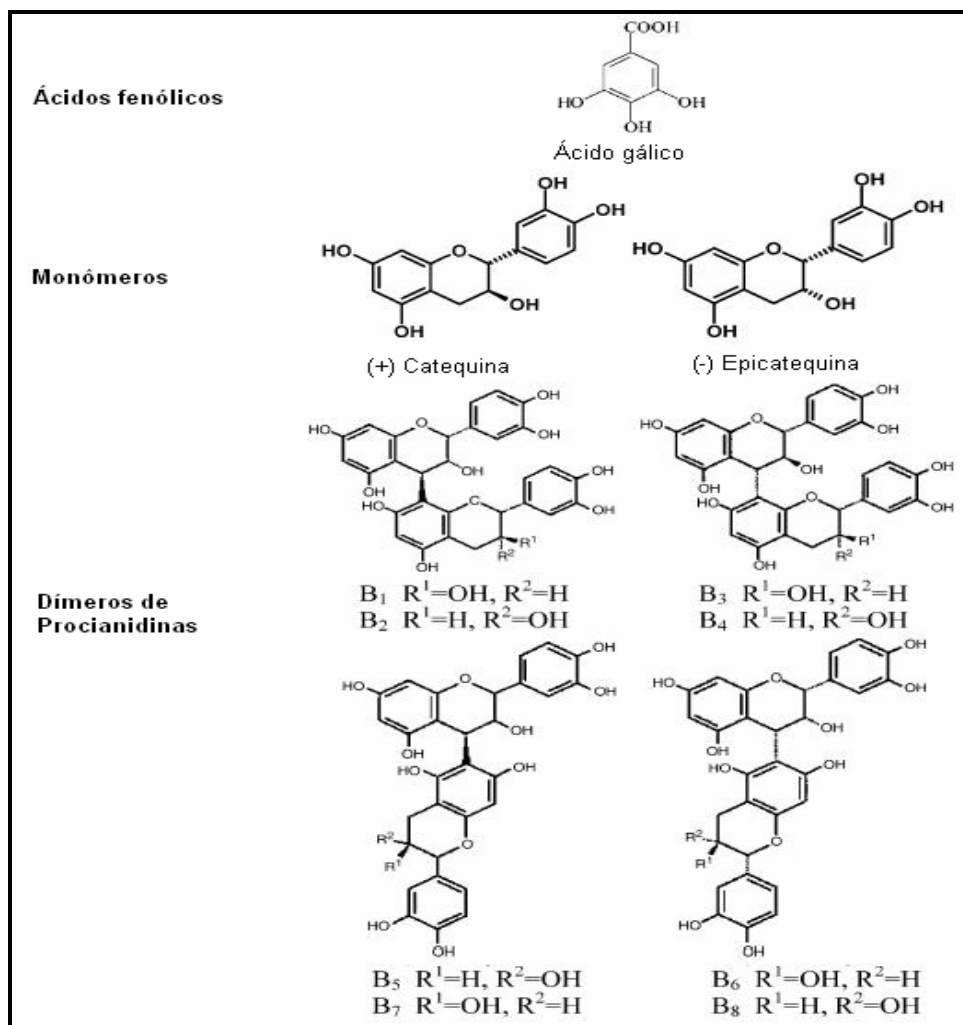


Figura 4: Compostos fenólicos presentes na casca e na semente de uva.

2.5 TÉCNICAS PARA A ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS PRESENTES EM ÓLEOS VEGETAIS

As técnicas de análises cromatográficas e espectroscópicas são utilizadas para identificar, caracterizar e quantificar os analitos presentes nas amostras de óleos vegetais.

As principais técnicas utilizadas são a cromatografia gasosa e líquida e técnicas espectroscópicas como [104-114]: ultravioleta visível (UV-VIS), ressonância magnética nuclear (NMR) infravermelho (IR) e espectrometria de massas (MS).

Os analitos de baixa massa molecular e que apresentam pontos de ebulição inferiores a 300°C são analisados por cromatografia gasosa. Porém, compostos com massa molecular elevada ou que apresentam sensibilidade a altas temperaturas devem ser analisadas por cromatografia líquida [104-118].

2.6 DERIVATIZAÇÃO

O termo derivatização refere-se, em cromatografia, à transformação de um composto químico em outro com o intuito de obter-se uma análise mais rápida, ou conveniente. Esta melhora pode ser obtida tanto na etapa de preparo da amostra quanto na de análise. O novo composto formado geralmente apresenta uma ou mais das seguintes vantagens em relação ao composto de partida: é mais fácil de ser extraído ou analisado, ou pode ser medido com maior sensibilidade ou exatidão, ou ser mais facilmente separado de interferentes [115].

Neste sentido uma das maiores limitações da cromatografia gasosa pode ser contornada através da derivatização: a elevada polaridade, baixa volatilidade e/ou estabilidade térmica de vários compostos orgânicos [115].

Existem diferentes procedimentos para se realizar uma derivatização [119,120], sendo que o mais utilizado em amostras que contém ácidos graxos é a metilação usando BF_3 em solução de metanol, que substitui o hidrogênio reativo pelo grupo metila ($-\text{CH}_3$) [63,121-123], (**Figura 5**). Para a esterificação de ácidos carboxílicos ainda pode ser usada uma solução de ácido (HCl ou H_2SO_4) com metanol [119].

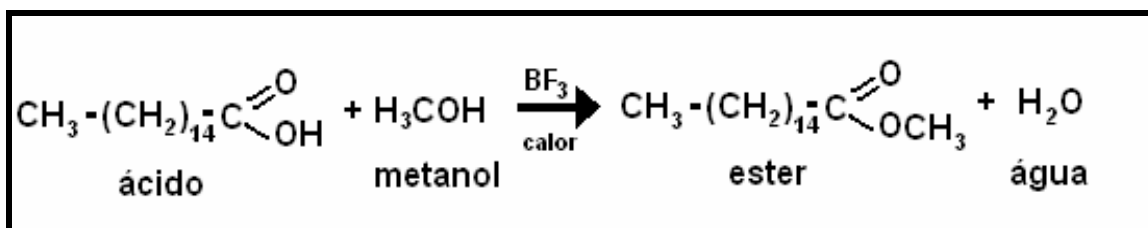


Figura 5: Reação de esterificação do ácido palmítico com metanol, catalisada pelo trifluoreto de boro

Outros reagentes que podem ser usados para a derivatização de grupos ácidos ou fenólicos, muito utilizados em compostos polares, são os sililizantes, como é o caso do BSTFA (n,o-bis trimetilsilil-trifluor acetamida) + TMCS (trimetilclorosilano) [123-126]. A combinação do BSTFA e TMCS resulta em um produto versátil, que reage com uma grande quantidade de compostos orgânicos substituindo o hidrogênio ativo pelo grupo trimetilsil ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$). O TMCS aumenta a reatividade do BSTFA na silanização dos analitos. Esta reação está representada de forma esquemática na **Figura 6** [120].

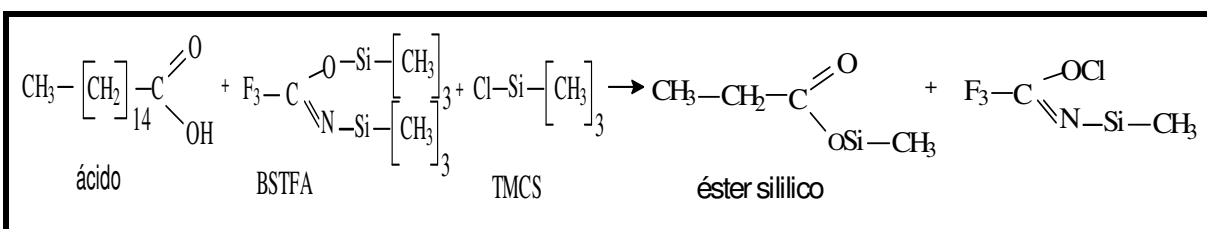


Figura 6: Reação de sililação do ácido palmítico com BSTFA e TMCS.

2.7 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental é uma ferramenta que pode ser utilizada quando se têm muitas variáveis (fatores) que se pretende estudar, na tentativa de extrair o maior número de informações com o menor número de experimentos [127].

A resolução desse problema experimental seguiu, durante muito tempo, o método empírico de tentativa e erro ou aqueles onde as variáveis, menos uma, eram mantidas constantes. Esta abordagem representa um gasto desnecessário de tempo, esforço e recursos [128]. Contraposta a essa sistemática, a abordagem moderna utiliza metodologias estatísticas de planejamento e otimização de experimentos que se têm mostrado bastante promissoras [129].

Alguns exemplos dessas metodologias são: planejamentos fatoriais completos e fracionários [127,130]. Essas metodologias estatísticas implicam a elaboração de um planejamento experimental, caracterizada por uma série de

fatores que agem sobre a resposta investigada. O resultado final é a identificação, observação e quantificação das alterações nas variáveis [130,131].

Um planejamento fatorial é aquele onde todos os fatores estudados variam de maneira constante e de forma planejada [132]. Os planejamentos fatoriais são representados por uma notação exponencial (x^n), onde a base indica o número de níveis e o expoente, o número de fatores [133]. A primeira linha denota o experimento no qual todos os fatores estão em seu nível inferior e a última linha, aquele no qual os fatores estão em seu nível superior. Este tipo de tabela, característica para a análise de experimentos fatoriais, é denominado Tabela de Yates [127,131].

Os planejamentos fatoriais completos utilizam experimentos que têm como atributo principal incluir, em cada ensaio completo, todas as combinações possíveis entre os diferentes fatores [127,131].

Os planejamentos fatoriais fracionários são usados quando o número de fatores a ser investigado é alto e não se conhece, a priori, a relação completa de todas as variáveis que afetam a resposta, otimizando o número de ensaios sem que haja perda de informações significativas para o estudo [127].

A denominação de planejamentos fatoriais fracionários é 2^{n-1} , enquanto que o planejamento fatorial completo com n fatores seria denominado 2^n [127].

A informação obtida através desses experimentos procede de duas fontes: respostas obtidas para cada fator e respostas resultantes da mudança entre os níveis de cada fator, cujos efeitos refletem-se na resposta da interação entre os demais fatores [133,134].

3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Os estudos foram realizados visando a extração e caracterização do óleo de semente de uva predominantemente cultivadas no estado do Rio Grande do Sul. Para melhor compreensão, o estudo foi dividido em métodos de extração (clássicos e modernos), e métodos de análise (qualitativos e quantitativos) conforme está descrito no organograma apresentado na **Figura 7**.

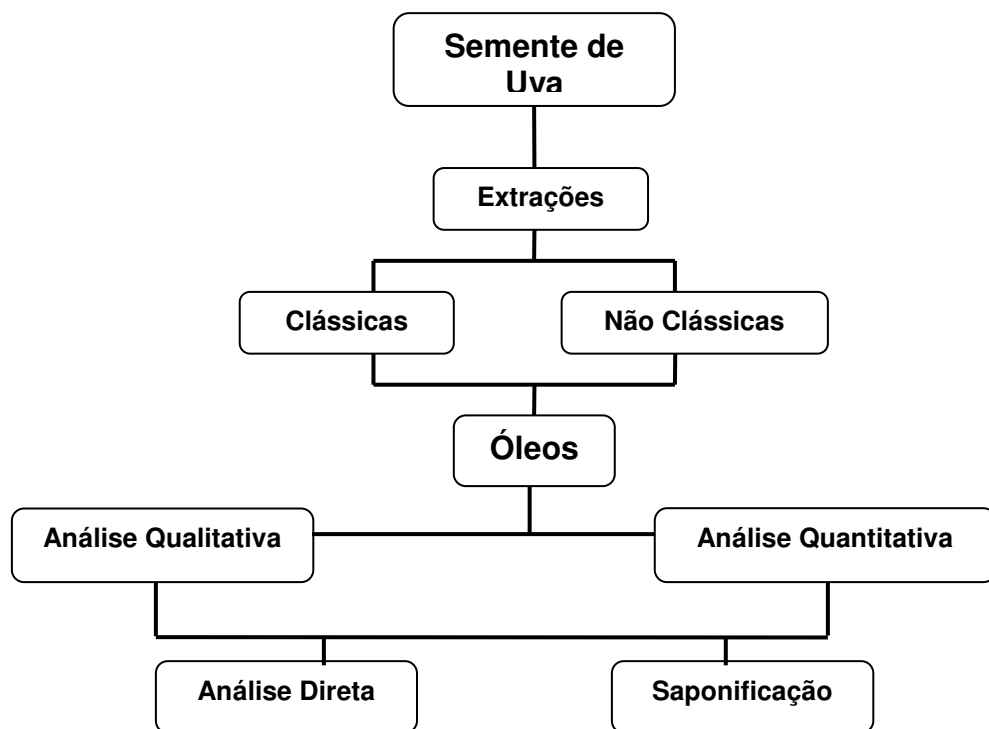


Figura 7: Organograma geral usado para o desenvolvimento do trabalho experimental

3.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

As coletas das amostras foram realizadas em março de 2004 e 2005 nas vinícolas Aurora/RS e Boscato/RS, respectivamente.

Nestas coletas as empresas forneceram todo o apoio técnico. As sementes foram escolhidas primeiramente pela demanda existente na fabricação dos vinhos da serra gaúcha. No primeiro ano, foi realizada a coleta de sementes do tipo Isabel, Herbemont e Seibel, sendo que as últimas duas variedades vieram misturadas com a variedade Isabel. Já no segundo ano, foram escolhidas sementes de uvas nobres, de grande valor comercial para a indústria ou que também estivessem disponíveis na fabricação de vinhos varietais como Cabernet, Isabel, Moscatel e Merlot. Para comparar os resultados dos óleos extraídos foram

adquiridos dois óleos comerciais de semente de uva, um utilizado como óleo comestível (Borges) e outro na indústria de cosméticos (Ipiranga).

As amostras foram trazidas das vinícolas em caixas térmicas fechadas. No laboratório passaram por um cuidadoso processo de limpeza para a remoção dos açúcares e outros interferentes.

Esse processo de limpeza visa remover interferentes e conservar melhor as sementes, durante o armazenamento. Para a limpeza, foram colocadas as amostras em grandes peneiras, onde em água corrente foram lavadas até retirada do açúcar visivelmente presente na amostra. Logo, receberam mais um banho com água deionizada e posteriormente com água deionizada aquecida a aproximadamente 100°C.

Para a secagem das sementes, as mesmas, foram colocadas em uma estufa com circulação de ar onde o processo durou aproximadamente 6 horas a uma temperatura de 100°C, como é recomendado pela literatura [16]. A seguir realizou-se o teste de umidade para verificar se esta encontrava-se abaixo de 6 % para o armazenamento.

As sementes inteiras, previamente limpas e secas, foram armazenadas em frascos de vidro de 3 litros, cobertos por papel alumínio para evitar a presença da luz, com umidade inferior a 6 % e a uma temperatura inferior a 30°C.

As sementes de uva, antes da extração por qualquer um dos métodos empregados, foram moídas em um moinho para sementes, durante 4 segundos conferindo às amostras diâmetros de partículas entre $0,014 \pm 0,01$ mesh.

3.3 PADRÕES E REAGENTES

Os padrões para a análise quantitativa foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich com aproximadamente 99,9% de pureza, enquanto que os demais solventes utilizados como hexano, heptano, diclorometano e acetato de etila de grau analítico foram comprados da Merck ou bidestilados quando de outras marcas.

Os derivatizantes utilizados (solução metanólica de 12 % BF_3 e BSTFA:TMCS - 99:1) foram ambos adquiridos da empresa Sigma –Aldrich.

3.4 EXTRAÇÕES DAS AMOSTRAS

A amostra utilizada para realizar todos os planejamentos experimentais foi uma mistura de sementes das variedades Isabel e Herbemont. Estas sementes são responsáveis por mais de 50% da produção do Rio Grande do Sul. Os métodos empregados foram a prensagem e a extração com solvente (Soxhlet), como métodos clássicos e técnicas mais modernas como ultra-som, extração com líquido pressurizado (PLE) e extração com fluido supercrítico (SFE).

As características de cada método de extração estão relatadas nos itens subsequentes.

3.4.1 EXTRAÇÕES CLÁSSICAS

3.4.1.1 EXTRAÇÃO POR PRENSAGEM

A prensagem do óleo foi realizada em uma prensa Bovenau com capacidade de 15 toneladas, onde a célula extratora foi confeccionada na oficina mecânica do Instituto de Química, da UFRGS, feita de aço, totalmente desmontável para melhor manuseio e para facilitar a limpeza das amostras.

Para a extração do óleo foram usadas 50 gramas de semente de uva, previamente limpas, secas e moídas, por um período de 72 horas com 10

toneladas para a prensagem, sendo que após este período não havia mais escoamento do óleo. A **Figura 8** mostra a prensa e a célula extratora utilizada na extração das amostras de óleo de semente de uva.

A célula extratora foi limpa antes e depois de cada extração e acondicionada fora da prensa quando não estava em uso. As amostras foram extraídas em triplicata.

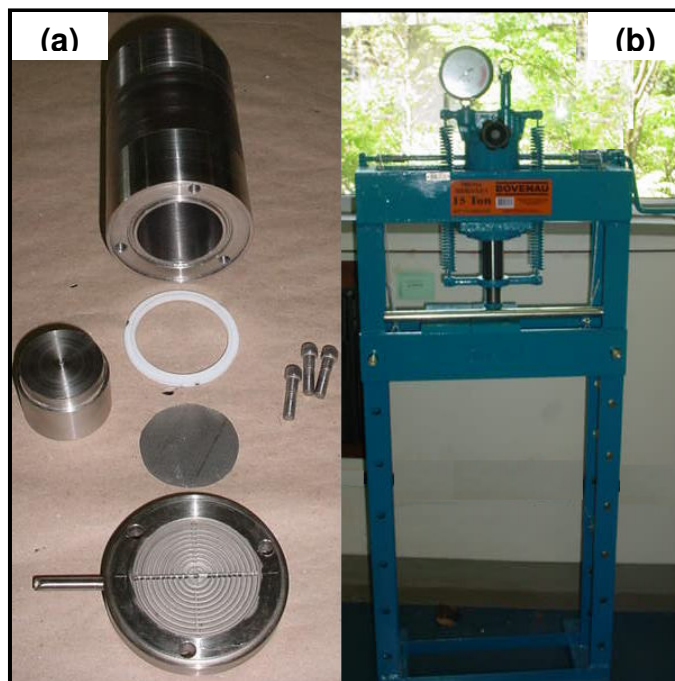


Figura 8: Fotografia da célula extratora (a) e prensa utilizada (b) na extração do óleo de semente de uva.

3.4.1.2 EXTRAÇÃO COM SOXHLET (SOX)

As extrações com Soxhlet utilizaram como solvente o hexano ($PE = 68^{\circ}C$), para comparar com o método comercial. Os cartuchos extratores foram previamente limpos em diclorometano (DCM) por extração em Soxhlet e secos à temperatura ambiente para evitar possíveis contaminantes.

Para a extração do óleo, em diferentes variedades de sementes de uva, foram utilizados aproximadamente 10 g de amostra e 150 mL de solvente. A

extração ocorreu em 20 horas, conforme descrito na literatura [15], realizando dois ciclos por minuto. A **Figura 9** apresenta de forma esquemática o desenho do aparelho de Soxhlet utilizado na extração do óleo de semente de uva.

Após o período de extração, as sementes encontram-se no cartucho e a amostra contendo o óleo e o solvente, é recolhida em um balão. A seguir, o óleo em solvente é rota-evaporado para a redução do volume. Para assegurar que amostra continha somente óleo foi seca sob fluxo de nitrogênio e armazenada em um dessecador até massa constante, para posterior calculo do rendimento.



Figura 9: Esquema do extrator de Soxhlet utilizado na extração do óleo de semente de uva.

3.4.2 EXTRAÇÕES NÃO CLÁSSICAS

3.4.2.1 EXTRAÇÃO COM ULTRA-SOM (US)

Empregou-se um equipamento de ultra-som Ultrasonic Cleaner, modelo USC-4800, potência de 120 W com uma frequência de 40 kHz e com uma intensidade de radiação de $0,27 \text{ W/cm}^2$. A **Figura 10** apresenta um esquema do equipamento usado. As dimensões do banho foram de 24 cm x 14 cm x 10 cm.

Utilizaram-se dois erlenmeyers de 250 mL, com boca esmerilhada, conectados a um condensador com 30 cm de altura.

A água do banho do equipamento foi mantida, por todo o tempo, a uma temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, para evitar possível influência de temperaturas elevadas no processo de extração.

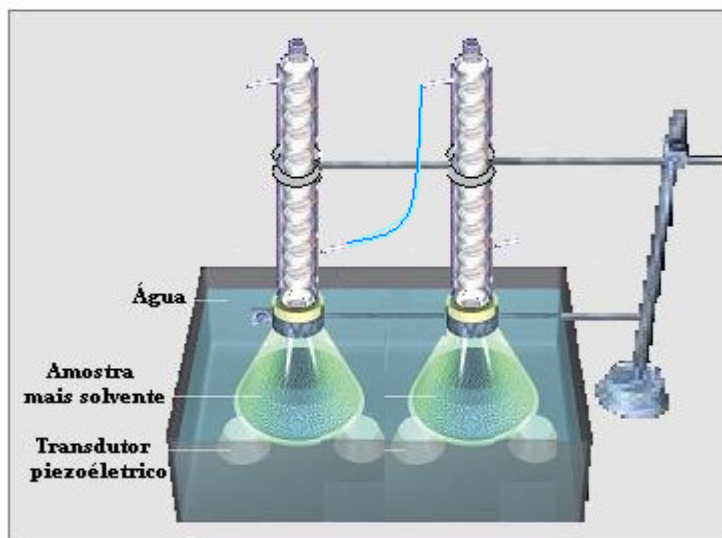


Figura 10: Esquema do ultra-som utilizado para a extração óleo de semente de uva.

As condições experimentais, para a extração com ultra-som, foram otimizadas empregando um modelo empírico fatorial a partir do planejamento experimental 2^3 , que incluiu a avaliação dos seguintes parâmetros:

- a) tempo de extração (X1):** avaliaram-se as respostas dos tempos de 10 e 30 minutos;
- b) quantidade de amostra (X2):** analisou-se a massa de 1 e 3 g de semente;
- c) quantidade de solvente (X3):** empregou-se 25 e 100 mL de solvente.

A matriz gerada por este planejamento experimental fatorial tem o total de 8 condições experimentais e está representada na **Tabela IX**.

Tabela IX: Matriz utilizada no planejamento fatorial 2^3 com ultra-som

| Exp | X ₁ (min) | X ₂ (g) | X ₃ (mL) | Exp | X ₁ (min) | X ₂ (g) | X ₃ (mL) |
|-----|----------------------|--------------------|---------------------|-----|----------------------|--------------------|---------------------|
| 1 | 30 (-) | 1 (-) | 25 (-) | 5 | 30 (-) | 1 (-) | 100 (+) |
| 2 | 120 (+) | 1 (-) | 25 (-) | 6 | 120 (+) | 1 (-) | 100 (+) |
| 3 | 30 (-) | 3 (+) | 25 (-) | 7 | 30 (-) | 3 (+) | 100 (+) |
| 4 | 120 (+) | 3 (+) | 25 (-) | 8 | 120 (+) | 3 (+) | 100 (+) |

As extrações utilizaram, além do solvente convencional para óleos (hexano), outros solventes extratores como solução de hexano:DCM (1:1), DCM e acetato de etila. Após a extração, foi realizado o cálculo do rendimento do óleo extraído em relação à massa de semente uva e as amostras foram analisadas por cromatografia, para avaliar se em solventes com diferentes polaridades há a distinção entre os compostos extraídos.

3.4.2.2 EXTRAÇÃO COM LIQUIDO PRESSURIZADO (PLE)

A extração PLE trabalha com solventes na região subcrítica, onde procura facilitar a extração dos analitos da amostra aplicando uma pressão constante de 1500 psi. Nessa extração, utilizou-se do equipamento de extração acelerada com solvente ASE 300™ da empresa Dionex, mostrado na **Figura 11**. Utilizaram-se células extratoras de aço inoxidável com capacidade de 34 mL, um frasco de lavagem (*rinse*) e frascos coletores de vidro transparente com capacidade de 250 mL. A extração, com esse equipamento, passa por diferentes passos até a coleta final da amostra de óleo, esse procedimento está esquematizado na **Figura 12**.



Figura 11: Equipamento de Extração acelerada por solventes da Dionex (ASE 300™)

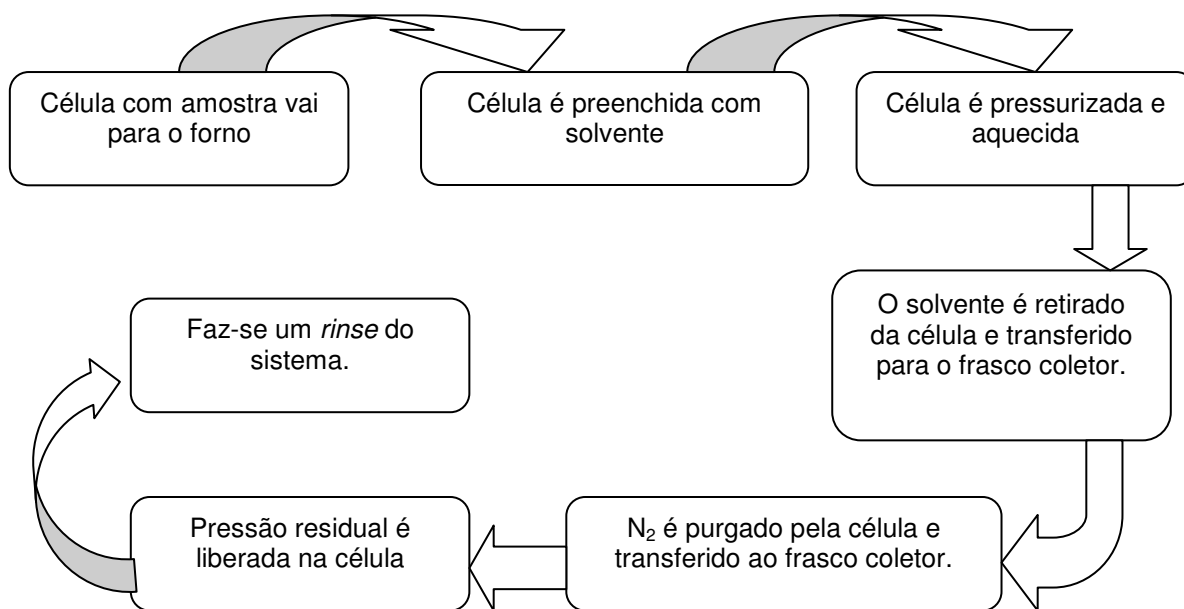


Figura 12: Esquema do procedimento de extração com PLE

Para a extração com ASE elaborou-se um planejamento experimental fracionário 2^{5-1} [127,134], que incluía a avaliação das seguintes variáveis e níveis:

- a) **Quantidade de amostra (X1):** 1 e 3 gramas;
- b) **Tempo de extração (X2):** 10 e 30 minutos;
- c) **Número de ciclos (X3):** 1 e 3 ciclos de extração;
- d) **Temperatura (X4):** 25°C e 100°C;
- e) **Volume de solvente (*flush*) (X5):** 30 e 150% do volume do frasco.

A matriz gerada, por este planejamento experimental, apresenta o total de 16 condições experimentais, está representada na **Tabela X**. Após a extração, foi realizado o cálculo do rendimento do óleo extraído em relação à massa de semente uva e as amostras foram analisadas por cromatografia.

Tabela X: Matriz do planejamento experimental 2^{5-1} para a extração com PLE.

| exp | massa (g) (X1) | tempo (min) (X2) | ciclos (X3) | temperatura (°C) (X4) | flush (%) (X5) |
|-----|-------------------|---------------------|----------------|--------------------------|-------------------|
| 1 | 1g (-) | 10 (-) | 1 (-) | 25 (-) | 150 (+) |
| 2 | 3g (+) | 10 (-) | 1 (-) | 25 (-) | 30 (-) |
| 3 | 1g (-) | 30 (+) | 1 (-) | 25 (-) | 30 (-) |
| 4 | 3g (+) | 30 (+) | 1 (-) | 25 (-) | 150 (+) |
| 5 | 1g (-) | 10 (-) | 3 (+) | 25 (-) | 30 (-) |
| 6 | 3g (+) | 10 (-) | 3 (+) | 25 (-) | 150 (+) |
| 7 | 1g (-) | 30 (+) | 3 (+) | 25 (-) | 150 (+) |
| 8 | 3g (+) | 30 (+) | 3 (+) | 25 (-) | 30 (-) |
| 9 | 1g (-) | 10 (-) | 1 (-) | 100 (+) | 30 (-) |
| 10 | 3g (+) | 10 (-) | 1 (-) | 100 (+) | 150 (+) |
| 11 | 1g (-) | 30 (+) | 1 (-) | 100 (+) | 150 (+) |
| 12 | 3g (+) | 30 (+) | 1 (-) | 100 (+) | 30 (-) |
| 13 | 1g (-) | 10 (-) | 3 (+) | 100 (+) | 150 (+) |
| 14 | 3g (+) | 10 (-) | 3 (+) | 100 (+) | 30 (-) |
| 15 | 1g (-) | 30 (+) | 3 (+) | 100 (+) | 30 (-) |
| 16 | 3g (+) | 30 (+) | 3 (+) | 100 (+) | 150 (+) |

3.4.2.3 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE)

Para a extração com SFE utilizou-se um equipamento de bancada construído no laboratório de altas pressões da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI-Erechim). A **Figura 13** mostra o equipamento utilizado para as extrações com fluido supercrítico.



Figura 13: Fotografia do sistema utilizado para as extrações com fluidos supercríticos. (A) – cilindro de gás; (B) e (C) – banhos termostáticos; (D) – extrator; (E) - válvula agulha; (F) – bomba de alta pressão; (G) – bomba para solvente modificador; (H) - fita de aquecimento.

Foram realizadas algumas extrações utilizando CO₂ como solvente e outras utilizando propano. Após, foram realizadas extrações com solventes modificadores hexano, mistura de hexano:diclorometano (1:1 v/v), diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol em CO₂ como fluido principal. A massa utilizada em todos os experimentos com SFE, foi de aproximadamente 10 gramas de amostra.

Para os experimentos com CO₂ utilizou-se as condições descritas na **Tabela XI** com o fluxo de 2 mL min⁻¹ e coleta de amostra de 20 em 20 minutos ao longo de 220 minutos.

Tabela XI: Experimentos realizados utilizando CO₂ como solvente supercrítico.

| exp. | temperatura (°C) | pressão (bar) | **densidade reduzida (ρ^*) |
|---------------------|------------------|---------------|-----------------------------------|
| CO ₂ - 1 | 30 | 110 | 1,7 |
| CO ₂ - 2 | 45 | 181,6 | 1,7 |
| CO ₂ - 3 | 60 | 254 | 1,7 |
| CO ₂ - 4 | 45 | 108 | 1,1 |
| CO ₂ - 5 | 45 | 118,4 | 1,4 |
| CO ₂ - 6 | 45 | 250 | 1,85 |
| CO ₂ - 7 | 45 | 60 | 0,83 |

$$**\rho^* = \rho/\rho_{\text{crítica}}$$

Para os experimentos com propano foram utilizadas as condições descritas na **Tabela XII** com o fluxo de 2 mL min⁻¹ e coleta de amostra de 1 em 1 minuto até 5 minutos e após 10 em 10 minutos com o total de tempo de 30 minutos.

Tabela XII: Experimentos realizados utilizando propano como solvente supercrítico.

| exp. | temperatura (°C) | pressão (bar) | **densidade reduzida (ρ^*) |
|----------|------------------|---------------|-----------------------------------|
| Prop - 1 | 30 | 100 | 2,35 |
| Prop - 2 | 45 | 100 | 2,25 |

$$**\rho^* = \rho/\rho_{\text{crítica}}$$

Para os experimentos com solventes modificadores (SMOD), os estudos foram divididos em dois grupos, a concentração destes solventes adicionados ao longo da extração foi calculada com base na massa molecular de cada solvente. Estes experimentos ocorreram em temperatura de extração de 45°C, 181 bar, fluxo de 2 mL min⁻¹, com coleta de amostra de 20 em 20 minutos ao longo de 220 minutos de extração.

No primeiro grupo, foram utilizados os SMOD hexano, mistura de hexano:diclorometano (1:1 v:v), diclorometano, acetato de etila e metanol. No segundo grupo de extrações, foi utilizado o etanol como solvente modificador, onde as suas concentrações variaram de acordo com a **Tabela XIII**.

Inicialmente, antes de fechar a célula extratora, faz-se necessário a adição de uma determinada quantidade de solvente modificador, dentro da célula (Tabela

XIII). Após, ajusta-se as condições dos experimentos com a pressão e temperatura determinadas e preenche-se o restante da célula com solvente extrator (CO₂).

Tabela XIII: Condições experimentais desenvolvidas com etanol.

| exp. | SMOD (% m/m) | fluxo de CO ₂ mL min ⁻¹ | fluxo de etanol mL min ⁻¹ | etanol inicial (mL) |
|--------|------------------|--|---|------------------------|
| Et – 1 | 3 | 1,92 | 0,08 | 2,66 |
| Et – 2 | 5 | 1,87 | 0,13 | 4,43 |
| Et – 3 | 10 | 1,74 | 0,26 | 10,13 |
| Et – 4 | 15 | 1,62 | 0,38 | 13,20 |
| Et – 5 | 20 | 1,50 | 0,50 | 17,54 |

3.5 ANÁLISE DOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA

A identificação e quantificação de compostos orgânicos presentes no óleo de semente uva foi realizada utilizando diferentes ferramentas cromatográficas de análise devido à complexidade do óleo bruto analisado: GC/MS (cromatografia gasosa com detector de massas), HPLC/UV-Vis (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta-visível) e HPLC/RID (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração).

Para avaliar o conteúdo da amostra extraída, o estudo iniciou-se com a análise qualitativa dos óleos. Após terem sido identificados alguns compostos presentes na amostra, foi realizada a análise quantitativa destes compostos.

A análise dos óleos extraídos foi dividida em itens conforme a **Figura 14**, para melhor compreensão do trabalho.

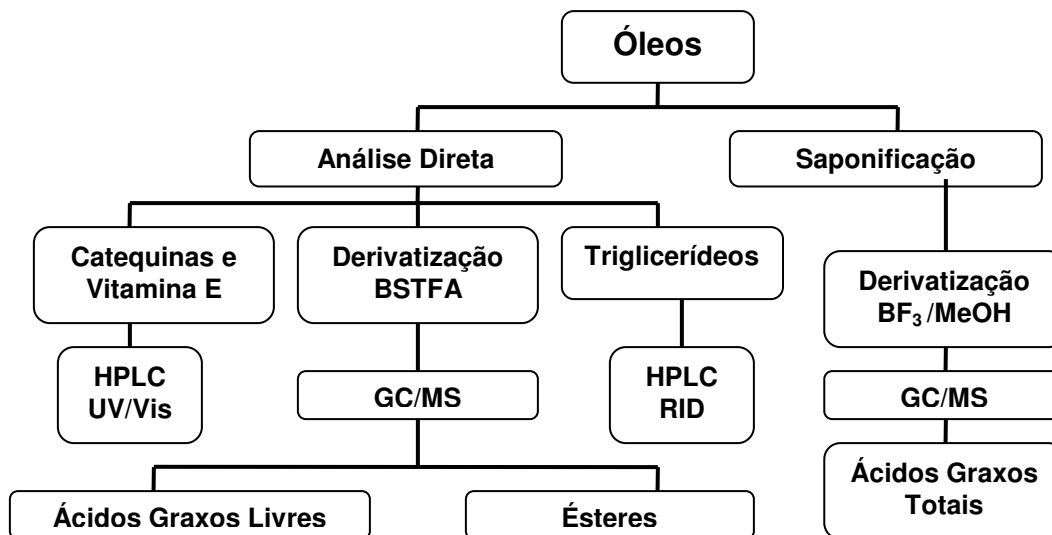


Figura 14: Esquema da análise cromatográfica do óleo de semente de uva

3.5.1 ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS (AGT)

Para a análise dos ácidos graxos totais presentes no óleo de semente de uva foi necessária a saponificação e posterior reação de esterificação destes óleos vegetais. A reação de saponificação baseia-se na quebra da molécula de triacilglicerol, formando glicerol e sais de metais alcalinos. Ao mesmo tempo, que esse procedimento está acontecendo ocorre a reação de derivatização que corresponde ao deslocamento do metal alcalino pela metila do metanol presente no meio reacional.

O procedimento utilizado nesse trabalho foi baseado no método de Hermann para a esterificação com álcool metílico [135-137]. Foram pesados 100 mg de óleo em um erlenmeyer de 100 mL e adicionados 5 mL de solução metanólica de NaOH.

A seguir acoplou-se ao erlenmeyer um condensador e deixou o sistema em refluxo por 10 min em ebulição. Então foram adicionados 3 mL de tri-fluoreto de

boro (BF_3) dissolvido em metanol. A mistura permaneceu em ebulição por dois minutos, em chapa de aquecimento com agitação, sendo então adicionado 5 mL de heptano. Após 1 min a reação foi deixada esfriar naturalmente e recebeu pela parte superior do condensador 5 mL de solução saturada com cloreto de sódio. Finalmente a agitação foi suspensa, a solução transferida para um tubo de ensaio onde a fase orgânica foi retirada. Essa por sua vez foi filtrada em sulfato de sódio anidro e transferida para um balão volumétrico de 10 mL que continha padrão interno (behenato de metila) para a análise de ésteres.

Para análise qualitativa dos ácidos graxos totais presente no óleo de semente de uva foi utilizado o cromatógrafo gasoso da Shimadzu, modelo GC-17A acoplado ao detector de espectrometria de massa da Shimadzu, modelo 5050A, com a biblioteca Wiley 229. O processo de ionização nesse equipamento é de impacto eletrônico com 70 eV. A coluna capilar usada foi uma OV-05 (metil silicone com 5 % de grupos fenila) com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase estacionária. Usou-se Hélio como gás de arraste com um fluxo de 1 mL min^{-1} . A injeção foi no modo split (1:10). O Injetor foi mantido a 280°C e interface a 300°C. O aquecimento do forno obedeceu a seguinte seqüência: temperatura inicial de 120°C, mantida por 5 min e temperatura final de 280°C com aquecimento por 2°C/min. O forno foi mantido na temperatura final por 20 min. O sistema operou no modo SCAN, permitindo a comparação dos espectros obtidos com aqueles da biblioteca de espectros do equipamento, além do uso de padrões cromatográficos injetados nas mesmas condições que a amostra.

Para a análise quantitativa dos ésteres formados, foram selecionados íons que pudessem ser monitorados pelo modo SIM (*Single Ion Monitoring* - monitoramento de íons selecionados) e quantificados separadamente. A fórmula molecular e os íons monitorados para os ésteres analisados estão descritos na **Tabela XIV**.

Tabela XIV: Ésteres utilizados para a análise quantitativa de ácidos graxos totais

| AG(*) | compostos | fórmula molecular | íons |
|-------|-------------------------|-------------------|------|
| C12:0 | laurato de metila | $C_{13}H_{26}O_2$ | 74 |
| C14:0 | miristato de metila | $C_{15}H_{30}O_2$ | 74 |
| C16:1 | palmitoleato de metila | $C_{17}H_{32}O_2$ | 74 |
| C16:0 | palmitato de metila | $C_{17}H_{34}O_2$ | 74 |
| C18:2 | linoleato de metila | $C_{19}H_{34}O_2$ | 81 |
| C18:1 | oleato de metila | $C_{19}H_{36}O_2$ | 69 |
| C18:0 | estearato de metila | $C_{19}H_{38}O_2$ | 74 |
| C18:3 | linolenato de metila | $C_{19}H_{32}O_2$ | 74 |
| C20:0 | araquidato de metila | $C_{21}H_{42}O_2$ | 74 |
| C24:0 | lignocerato de metila | $C_{25}H_{50}O_2$ | 74 |
| C22:0 | behenato de metila (PI) | $C_{23}H_{46}O_2$ | 74 |

AG(*): indicação usada para ácidos graxos (nº de carbonos: nº de ligas duplas)

A partir das soluções estoques de concentrações na faixa de 1500 mg L^{-1} para cada padrão, foi preparada uma solução com a mistura de todos os ésteres citados com concentração de 25 mg L^{-1} . Esta solução recebeu 25 mg L^{-1} de behenato de metila (padrão interno - PI). A partir desta solução foi realizada a otimização das condições de análise no sistema GC/MS. As condições finais de análise foram idênticas às usadas no processo qualitativo descrito, exceto pelo modo de análise e pela rampa de aquecimento da coluna. O aquecimento do forno obedeceu a seguinte seqüência: temperatura inicial de 160°C , mantida por 5 min, aquecendo-se o forno primeiramente a uma taxa de $15^\circ\text{C}/\text{min}$ até 190°C , alterou-se a taxa de aquecimento para $2^\circ\text{C}/\text{min}$ até 205°C , permaneceu nessa temperatura por 10min e a partir daí até a temperatura final de 280°C a uma taxa de aquecimento de $2^\circ\text{C}/\text{min}$. O forno foi mantido na temperatura final por 10 min.

Para determinação da composição quantitativa dos ácidos presentes na amostra, utilizou-se o método de Moretto e Fett [14]. Sabendo que a intensidade do sinal dada pelo detector não é dependente somente da quantidade, mas

também do tipo do composto, foram utilizados fatores de resposta para a conversão da área do pico em porcentagem em massa. Os fatores de respostas foram calculados a partir da composição conhecida da mistura padrão e as áreas de pico de acordo com a **Equação 1**:

$$f_i = \frac{C_{im}}{A_{im}} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: f_i é o fator de resposta do composto i ;
 C_{im} é a concentração do composto i na mistura padrão em porcentagem de massa;
 A_{im} é a porcentagem de área do composto i .

O cálculo da composição em porcentagem em massa é feito de acordo com a **Equação 2**:

$$C_i = \frac{100 \cdot A_i \cdot f_i}{A_1 f_1 + A_2 f_2 + \dots + A_n f_n} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: C_i é a concentração do composto em porcentagem em massa;
 A_i é a área do pico do composto i ;
 f_i é o fator de resposta do composto i .

3.5.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS NÃO LIGADOS AO GLICEROL

A análise qualitativa correspondente à caracterização da fração não ligada ao glicerol (fração livre), para a análise destes compostos fez-se uso da derivatização com BSTFA/TMCS. O uso deste derivatizante permite que a análise seja dada de forma simples, rápida e sem fatores de interferência, como a temperatura. Além disso, os espectros de massas dos compostos siliados são mais precisos, com um íon característico (73), diferenciando de possíveis compostos metilados presentes na amostra. Os compostos presentes nesta fração, analisáveis por cromatografia gasosa, são genericamente classificados como compostos orgânicos voláteis presentes no óleo. Os compostos mais

pesados permanecem no *liner* do injetor, não sendo analisados cromatograficamente. Inicialmente, fez-se um estudo da proporção necessária entre amostra/BSTFA. Aproximadamente 20 mg de óleo necessitam de 20 µL de da mistura BSTFA/TMCS (99:1) para silição total dos compostos.

Para análise qualitativa dos compostos orgânicos voláteis presentes neste óleo, foi utilizado as mesmas condições usadas na análise qualitativa dos AGTs.

Para a análise quantitativa foram usados os padrões e íons monitorados descritos na **Tabela XV**, e o método de padronização interna. Foram quantitativamente determinados apenas os ácidos graxos livres (AGL), neste caso analisados na forma de seus derivados siliados, os ésteres metílicos e os ésteres etílicos pré-existentes no óleo. Os fitosteróis não foram quantificados pela ausência de padrões adequados.

Tabela XV: Íons monitorados dos analitos quantificados nas amostras de óleos.

| AG(*) | ácidos(**) | Íons | | |
|-------|--------------|-------------------|------------------|---------------|
| | | ésteres metílicos | ésteres etílicos | ácidos(***) |
| C12:0 | láurico | 74 | não analisado | 73 |
| C14:0 | mirístico | 74 | 88 | 73 |
| C16:1 | palmitoleico | 74 | não analisado | não analisado |
| C16:0 | palmítico | 74 | 88 | 73 |
| C18:2 | linoléico | 74/81 | 88 | 73 |
| C18:1 | oléico | 74/69 | 88 | 73 |
| C18:0 | esteárico | 74 | 88 | 73 |
| C18:3 | linolenico | 74 | 88 | não analisado |
| C20:0 | araquídico | 74 | 88 | 73 |
| C24:0 | lignocérico | 74 | não analisado | 73 |

AG(*): indicação usada para ácidos graxos (nº de carbonos: nº de ligas duplas)

(**) padrão interno (PI): éster metílico do ácido behênico e o íon monitorado foi 74

(***) identificados como trimetil silil derivado (TMS)

As condições de análise foram idênticas às usadas no processo qualitativo, exceto pela coluna, modo de análise e pela rampa de aquecimento da coluna. Usou-se neste caso, o modo SIM (*Single Ion Monitoring* - Monitoramento de Íons

Selecionados). A coluna usada foi uma OV-5 com 60 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase estacionária.

O aquecimento do forno obedeceu a seguinte seqüência: temperatura inicial de 200°C, mantida por 8 min, aquecendo-se o forno primeiramente a uma taxa de 3°C/min até 235°C; alterou-se a taxa de aquecimento para 15°C/min até a temperatura final de 280°C, sendo mantido na temperatura final por 15 min.

3.5.3 TRIACILGLICEROL (TG)

O estudo de triacilglicerol presentes no óleo de semente de uva foi baseado no método oficial da AOAC 993.24 “Triglicerídeos por Número de Partição em Óleos Vegetais”. A cromatografia líquida de fase reversa e com detector de índice de refração foi utilizada como ferramenta analítica para a caracterização e quantificação dos triacilglicerol presentes nessas amostras. A metodologia tem como base a eluição de triacilglicerol em ordem crescente do número de carbonos equivalente, esta ordem é apresentada através da **Tabela XVI** descrita por El-Hamdy e Perkins [138] e confirmada com a análise do óleo de soja comparando com os dados da literatura.

O equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu, modelo LC 20 AT com detector de índice de refração da Shimadzu RID 20A com 40°C, empregando uma coluna Supelcosil C-18 (15 cm X 4,6 mm X 5 μm), com o volume de injeção de 20 μL , fluxo de 1,5 mL min⁻¹ e fase móvel composta de acetona e acetonitrila (1:1).

Para a identificação dos triacilglicerol foi utilizado a trilinoleína, tripalmitina, trilaurina e trioleína como padrão de referência. A identificação teve como base a construção de um gráfico que tinha como variáveis o número de ligações duplas (eixo X) versus o logaritmo da razão entre o tempo de retenção de um padrão determinado dividido pelo tempo de retenção da trioleína (eixo Y), termo simplificado como $\log \alpha(i)$.

Tabela XVI: Composição de triacilglicerol e seus números de carbonos equivalentes.

| | | Tempo ^a | | | | | | | | | |
|----------|--|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 36 | 38 | 40 | 42 | 44 | 46 | 48 | 50 | 52 | 54 |
| b | | 54:9 | 54:8 | 54:7 | 54:6 | 54:5 | 54:4 | 54:3 | 54:2 | 54:1 | 54:0 |
| | | 52:8 | 52:7 | 52:6 | 52:5 | 52:4 | 52:3 | 52:2 | 52:1 | 52:0 | |
| | | 50:7 | 50:6 | 50:5 | 50:4 | 50:3 | 50:2 | 50:1 | 50:0 | | |
| | | 48:6 | 48:5 | 48:4 | 48:3 | 48:2 | 48:1 | 48:0 | | | |
| | | 46:5 | 46:4 | 46:3 | 46:2 | 46:1 | 46:0 | | | | |
| | | 44:4 | 44:3 | 44:2 | 44:1 | 44:0 | | | | | |
| | | 42:3 | 42:2 | 42:1 | 42:0 | | | | | | |
| | | 40:2 | 40:1 | 40:0 | | | | | | | |
| | | 38:1 | 38:0 | | | | | | | | |
| | | 36:0 | | | | | | | | | |

^a ECN = (número de carbonos equivalente)

^b Indicador de triacilglicerol - 54:9 significa 54 átomos de carbono e 9 ligações duplas
Referência 136

3.5.4 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

A cromatografia líquida é uma ferramenta utilizada para compostos orgânicos não voláteis que necessitam serem quantificados de forma segura e confiável. O estudo de compostos com caráter antioxidante foi baseado em relatos da literatura que apresentavam indicações de possíveis compostos, provenientes da uva e também do material disponível no laboratório.

Alguns óleos vegetais possuem em sua composição compostos fenólicos, presentes na fração insaponificável, estes são responsáveis junto com as vitaminas por apresentar comportamento antioxidante. Dentre os compostos fenólicos presentes no óleo de semente de uva, procurou-se avaliar, primeiramente, a existência do ácido gálico, catequina, epicatequina e epigallocatequina.

A análise destes compostos foi realizada com a utilização do cromatógrafo líquido da Waters equipado com uma bomba de gradiente da Waters série 2695 e detector de UV/Vis da Waters série 2487 *Dual λ Absorbância Detector*, trabalhando a 280 nm, comprimento de onda este que é indicador de compostos

fenólicos. A coluna usada foi uma Gemini - C18, com 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 μm de tamanho de partícula. A pré-coluna usada foi uma Waters -C-18 com 20 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. Usou-se um *loop* de 50 μL e um fluxo de 1 mL min^{-1} . A fase móvel foi composta por (A) metanol e (B) Água: Ácido Acético (97:3). A variação na composição da fase (gradiente) está apresentada na **Tabela XVII**.

Tabela XVII: Composição do gradiente de fase para a análise por HPLC dos compostos fenólicos

| tempo (min) | metanol (A %) | água: ácido acético (97:3) (B %) |
|-------------|---------------|----------------------------------|
| 0 | 0 | 100% |
| 1 | 0 | 100% |
| 40 | 63 | 37 |
| 41 | 100 | 0 |
| 46 | 100 | 0 |
| 47 | 0 | 100 |

Além destes compostos, foi analisada a vitamina E (α -tocoferol), também fazendo uso deste mesmo sistema de HPLC/UV-Vis nas mesmas condições, exceto pela detecção em 292 nm (típica para vitamina E) e pela análise no modo isocrático tendo como fase móvel a mistura metanol: água (96:4).

A quantificação do α -tocoferol foi realizada pelo método de padronização externa a partir de soluções estoque individuais de aproximadamente 1000 mg L^{-1} . As misturas dos padrões destas soluções foram feitas com concentrações diferentes para a construção da curva de calibração. As concentrações utilizadas para a construção da curva estão descritas na **Tabela XVIII**.

Tabela XVIII: Concentração de vitamina E utilizada para a construção da curva de calibração

| curva de calibração | vitamina E em mg L⁻¹ |
|----------------------------|--|
| ponto 1 | 0,90 |
| ponto 2 | 1,81 |
| ponto 3 | 3,62 |
| ponto 4 | 4,52 |
| ponto 5 | 6,04 |
| Ponto 6 | 10,9 |

4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados das extrações do óleo de semente de uva serão apresentados e discutidos em três partes, com o intuito de obter uma melhor compreensão dos mesmos, na seguinte ordem:

1ª Parte: Estudo comparativo da eficiência de extração em termos de rendimento em massa para os diferentes métodos de extração aplicados às amostras de sementes de uva estudadas neste trabalho;

2ª Parte: Análise qualitativa e quantitativa dos óleos de semente de uva Isabel/Herbemont obtidos pelos diferentes processos de extrações estudadas neste trabalho;

3ª Parte: Análise qualitativa e quantitativa dos óleos de diferentes variedades de semente de uva, estudados neste trabalho, obtidos por prensagem, Soxhlet e PLE,.

4.1 ESTUDO COMPARATIVO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA: EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO

Os resultados de extração do óleo de sementes de uva das variedades: Isabel, mistura de Isabel/Herbemont, mistura de Isabel/Seibel, Cabernet e Moscatel estão divididos em duas seções: Métodos de extração clássicos (prensagem e Soxhlet) e modernos (US, PLE e SFE).

4.1.1 EXTRAÇÕES CLÁSSICAS: PRENSAGEM E SOXHLET

Realizou-se um estudo de processos de extrações clássicas: prensagem e Soxhlet com as diferentes variedades de uvas. Os resultados em termos de rendimento em massa estão apresentados na **Tabela XIX**:

Tabela XIX: Variação do rendimento em massa para os óleos extraídos de semente de uva pelos métodos de prensagem e Soxhlet

| Amostras | Rendimento em óleo na Extração (% m/m) | | | |
|------------------|--|--------|---------|-------|
| | Prensagem | DP (*) | Soxhlet | DP(*) |
| Herbemont/Isabel | 5,07 | 0,13 | 12,7 | 0,49 |
| Seibel/Isabel | 5,15 | 0,31 | 11,1 | 0,05 |
| Isabel | 1,35 | 0,25 | 7,4 | 0,07 |
| Cabernet | 4,21 | 0,04 | 11,1 | 0,08 |
| Moscatel | 6,66 | 0,14 | 10,8 | 1,00 |
| Merlot | 5,53 | 0,86 | 13,4 | 0,92 |

* DP : desvio padrão para duas determinações

Na extração por prensagem a variedade de uva Moscatel apresentou melhor rendimento em massa, seguida das uvas Merlot, e das misturas Herbemont/Isabel e Seibel/Isabel. Tendo em vista o baixo rendimento de óleo da variedade Isabel quando prensada sozinha, sugere-se que as variedades

Herbemont e Seibel sejam as responsáveis pela massa de óleo extraída quando misturadas.

Quando analisados os resultados das extrações com Soxhlet verifica-se que a variedade Merlot apresenta o maior rendimento. As demais variedades obtiveram resultado em torno de 11 %.

A vitivinicultura brasileira utiliza basicamente uvas híbridas como as variedades Isabel, Seibel e Herbemont, porém somente as uvas das variedades *Vitis viníferas* são empregadas atualmente na fabricação do óleo de semente de uva [17]. Os resultados das variedades de uvas brasileiras estudadas, conforme a **Tabela XIX**, mostraram-se satisfatórios com boa concordância com o rendimento em massa com o óleo comercial (que se encontra entre 10 e 20 %), com exceção da variedade Isabel que apresentou um rendimento inferior.

As amostras foram extraídas em duplicata e obtiveram um desvio padrão menor que 1 %. O maior desvio obtido foi da variedade Moscatel quando extraída com solvente (hexano).

4.1.2 OUTRAS EXTRAÇÕES: ULTRA-SOM, LÍQUIDO PRESSURIZADO E FLUIDO SUPERCRÍTICO

4.1.2.1 ULTRA-SOM

A extração por ultra-som não é comumente usada para a obtenção de óleo de sementes, mas, por apresentar uma grande versatilidade para a extração de diferentes amostras, fez-se uso desta ferramenta para estudar a qualidade e o rendimento do óleo extraído utilizando o banho de ultra-som.

Iniciou-se este estudo escolhendo um limite de tempo máximo de trabalho, que seria usado posteriormente para a construção do planejamento experimental. Visando obter em menor tempo de extração uma maior qualidade e rendimento do óleo fez-se uma série de extrações que variaram de 120 a 480 minutos de extração. Para este primeiro ensaio usou-se hexano como solvente extrator, 3 g

de semente de uva finamente moída e 100 mL do solvente. A **Tabela XX** mostra a média dos resultados obtidos, em duplicata, nesses experimentos.

Tabela XX: Variação do rendimento em massa para extração com ultra-som do óleo de semente de uva usando 3 g de semente de uva e 100 mL de solvente

| amostras | tempo | rend. (% m/m) |
|----------|-------|---------------|
| 1 | 120 | 10,1 |
| 2 | 180 | 9,67 |
| 3 | 240 | 8,77 |
| 4 | 300 | 9,98 |
| 5 | 360 | 9,47 |
| 6 | 420 | 9,59 |
| 7 | 480 | 8,86 |

Tendo em vista que a diferença do rendimento em óleo extraído não foi significativa nesta faixa de tempo, escolheu-se como melhor tempo de extração para planejamento experimental, 120 minutos. Os cromatogramas das amostras também não apresentaram diferenças significativas indicando que é possível trabalhar com este tempo de extração.

Através destes dados iniciais foi construído o planejamento experimental com os solventes: hexano (H), mistura de hexano:diclorometano (1:1 v/v) (HD), diclorometano (D) e acetato de etila (AE). Amostras com uma mistura das variedades das uvas Herbemont e Isabel foram usadas nas extrações que tem seus rendimentos em massa apresentados na **Tabela XXI**.

Aplicando-se os valores obtidos e usando o programa *Statistica for Windows*, obteve-se a seguinte expressão:

$$\text{Rend. Massa (\%)} = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_{12}X_1X_2 + A_{13}X_1X_3 + A_{23}X_2X_3 + A_{123}X_1X_2X_3$$

Equação 3

(*) onde as variáveis são X1 (massa, em gramas), X2 (tempo de extração, em minutos), X3 (volume de solvente extrator, em mL)

Tabela XXI: Rendimento em massa dos óleos obtidos por ultra-som usando o planejamento experimental descrito na **Tabela V**, com a amostra de semente de uva Isabel/ Herbemont

| Exp | Variáveis | | | Rend. % (m/m) | | | |
|-----|--------------------|----------------------|---------------------|---------------|-------|--------|-------|
| | X ₁ (g) | X ₂ (min) | X ₃ (mL) | H(*) | HD(*) | DCM(*) | AE(*) |
| 1 | 1 (-) | 30 (-) | 25 (-) | 9,55 | 9,30 | 9,61 | 10,6 |
| 2 | 1 (-) | 120 (+) | 25 (-) | 8,92 | 9,24 | 10,1 | 10,0 |
| 3 | 3 (+) | 30 (-) | 25 (-) | 9,37 | 8,02 | 9,47 | 8,53 |
| 4 | 3 (+) | 120 (+) | 25 (-) | 9,56 | 9,14 | 9,66 | 8,89 |
| 5 | 1 (-) | 30 (-) | 100 (+) | 10,0 | 10,6 | 9,85 | 10,6 |
| 6 | 1 (-) | 120 (+) | 100 (+) | 10,1 | 9,01 | 10,7 | 9,40 |
| 7 | 3 (+) | 30 (-) | 100 (+) | 9,80 | 8,54 | 8,81 | 9,00 |
| 8 | 3 (+) | 120 (+) | 100 (+) | 9,97 | 8,50 | 9,60 | 10,8 |

(*) solventes (H) hexano, (HD) solução hexano:diclorometano (1:1), (DCM) diclorometano e (AE) acetato de etila.

Através da análise dos dados apresentados na Tabela XXI, verificou-se que as variáveis usadas neste planejamento não resultaram em diferenças significativas quanto ao valor mínimo e máximo de rendimentos obtidos. Esta confirmação é explicada também pela análise estatística que mostrou não haver influência dos fatores isolados ou em grupos, uma vez que todos os valores de An encontrados foram inferiores a 1.

Entre os resultados de rendimento o menor valor obtido, 8,53 % (experimento 3 com hexano) e o maior 10,8 % (experimento 8 com acetato de etila), porém quando comparamos diferentes solventes na mesma condição experimental o coeficiente de correlação não ultrapassa 1,5 %, o que pode ser considerada uma variação muito pequena para justificar mudanças no método de extração.

Somente os resultados parciais do ultra-som são apresentados, pois, por problemas instrumentais, não foi possível realizar todos os experimentos com um mesmo instrumento (porque estragou de forma irreparável). Ao se utilizar um novo

equipamento, os resultados não se apresentaram comparáveis, indicando que todo o procedimento deveria ser repetido, o que já não era mais possível, até por falta de amostra. Desta forma, apenas estes resultados preliminares são apresentados e discutidos.

4.1.2.2 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE)

Para avaliar o rendimento da extração do óleo de semente de uva pela técnica de PLE, utilizou-se, inicialmente, as sementes das variedades Isabel e Herbemont. Foram empregados os mesmos solventes da extração com ultra-som: n-hexano, mistura de n-hexano e diclorometano (1:1), diclorometano e acetato de etila. Para cada solvente utilizado nesta técnica de extração, realizou-se um planejamento experimental semi-fatorial 2^{5-1} , onde foram avaliadas as variáveis em dois níveis: massa de semente de uva (1 e 3 g), tempo de extração (10 e 30 min), ciclos de extração (1 e 3), temperatura de extração (25 e 100°C) e *flush* (30 e 150 %). A matriz experimental com as variáveis reais e codificadas (-1 e +1), juntamente com os resultados do rendimento destas extrações, está apresentada na **Tabela XXII**.

Através da avaliação desta **Tabela** verifica-se que os óleos das sementes de uvas, da mistura das variedades Isabel e Herbement, produziram resultados semelhantes a outros óleos citados na literatura (5 à 20 %).

O rendimento obtido em extrações utilizando hexano como solvente extrator permaneceu entre 7 e 11 % de óleo extraído. Para as amostras extraídas com solução de hexano:DCM (1:1) e DCM esta faixa de rendimento foi estendida de 9,5 a 14 % e de 11 a 18,3 %, respectivamente. Por outro lado o acetato de etila, mesmo tendo índice de polaridade superior (4,3) aos demais solventes (hexano 0,06 e DCM 3,4), produziu rendimentos de 7 a 11,2 %.

Através destes dados foi possível avaliar e verificar que o solvente que obteve o melhor rendimento foi o DCM, porém as amostras extraídas com este solvente também apresentaram a maior diferença entre o menor e o maior rendimento. Os demais solventes tiveram os rendimentos variando em até 4 % de

óleo extraído. Comparando os resultados dos três primeiros solventes (hexano, hexano/DCM e DCM) verifica-se que o rendimento aumenta com o a medida que o diclorometano está em maior proporção. Este fato indica, o DCM como o melhor solvente extrator, em termos de rendimento em massa. Outra característica deste solvente é a facilidade de remoção após a extração, devido ao seu baixo ponto de ebulição (40,7°C).

Tabela XXII: Variação do rendimento em massa de óleo extraído por PLE, de acordo com as variáveis estudadas no planejamento experimental fatorial 2^{5-1} .

| Exp | Variáveis | | | | | Rend. % (m/m) | | | |
|-----|-----------|--------|-------|---------|---------|---------------|------|-------|------|
| | (X1) | (X2) | (X3) | (X4) | (X5) | H | HD | DCM | AE |
| 1 | 1g (-) | 10 (-) | 1 (-) | 25 (-) | 150 (+) | 6,99 | 9,79 | 11,0 | 8,56 |
| 2 | 3g (+) | 10 (-) | 1 (-) | 25 (-) | 30 (-) | 8,22 | 10,1 | 10,1 | 7,28 |
| 3 | 1g (-) | 30 (+) | 1 (-) | 25 (-) | 30 (-) | 9,15 | 10,2 | 11,3 | 7,93 |
| 4 | 3g (+) | 30 (+) | 1 (-) | 25 (-) | 150 (+) | 8,62 | 11,9 | 11,0 | 7,88 |
| 5 | 1g (-) | 10 (-) | 3 (+) | 25 (-) | 30 (-) | 8,86 | 10,7 | 11,3 | 7,86 |
| 6 | 3g (+) | 10 (-) | 3 (+) | 25 (-) | 150 (+) | 9,01 | 10,7 | 11,1 | 7,95 |
| 7 | 1g (-) | 30 (+) | 3 (+) | 25 (-) | 150 (+) | 9,30 | 10,6 | 10,6 | 7,09 |
| 8 | 3g (+) | 30 (+) | 3 (+) | 25 (-) | 30 (-) | 9,32 | 9,48 | 13,5 | 8,28 |
| 9 | 1g (-) | 10 (-) | 1 (-) | 100 (+) | 30 (-) | 9,67 | 9,82 | 10,6 | 8,12 |
| 10 | 3g (+) | 10 (-) | 1 (-) | 100 (+) | 150 (+) | 8,90 | 9,00 | 11,8 | 8,12 |
| 11 | 1g (-) | 30 (+) | 1 (-) | 100 (+) | 150 (+) | 10,6 | 10,9 | 11,4 | 9,43 |
| 12 | 3g (+) | 30 (+) | 1 (-) | 100 (+) | 30 (-) | 10,4 | 10,8 | 11,34 | 8,42 |
| 13 | 1g (-) | 10 (-) | 3 (+) | 100 (+) | 150 (+) | 9,93 | 10,7 | 11,9 | 9,35 |
| 14 | 3g (+) | 10 (-) | 3 (+) | 100 (+) | 30 (-) | 9,63 | 9,94 | 11,9 | 9,89 |
| 15 | 1g (-) | 30 (+) | 3 (+) | 100 (+) | 30 (-) | 10,6 | 11,6 | 12,2 | 10,4 |
| 16 | 3g (+) | 30 (+) | 3 (+) | 100 (+) | 150 (+) | 10,9 | 13,8 | 18,3 | 11,1 |

X1 (massa em gramas), X2 (tempo de extração em minutos), X3 (ciclos de extração), X4 (temperatura de extração em °C), X5 (flush em %)

(*) solventes (H) hexano, (HD) solução hexano:diclorometano (1:1), (DCM) diclorometano e (AE) acetato de etila.

Os estudos realizados com PLE apresentaram melhores resultados que a prensagem e Soxhlet. Comparando os rendimentos obtidos em hexano, o Soxhlet

chegou a 12,66 % enquanto para o método PLE obteve 11%, porém deve-se considerar que foram necessárias 20 horas para a extração com Soxhlet enquanto que para PLE o maior tempo utilizado foi de 90 minutos. Este desempenho da extração com PLE é conseguido pela influência da alta pressão (1500 psi), que força a entrada do solvente para dentro dos poros da matriz, extraíndo os analitos com maior facilidade, este processo normalmente não acontece quando a extração ocorre a pressão atmosférica.

Para análise dos efeitos das variáveis sobre o rendimento da extração do óleo de semente de uva pelo método de extração PLE, realizou-se um ajuste de um modelo empírico (Equação 4) aos dados experimentais. Os parâmetros de tal modelo (relacionados aos efeitos de cada variável e suas interações) foram analisados segundo o teste t de *Student* adotando 5% de chance de errar. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa *Statistica for Windows*, versão 6.0. Inicialmente, foi realizada a avaliação dos efeitos utilizando o modelo da **Equação 4**, cujos coeficientes (A_n) podem ser vistos na **Tabela XXIII**:

$$\text{Rend. Massa (\%)} = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_4X_4 + A_5X_5 + A_{12}X_1X_2 + A_{13}X_1X_3 + A_{14}X_1X_4 + A_{15}X_1X_5 + A_{23}X_2X_3 + A_{24}X_2X_4 + A_{25}X_2X_5 + A_{34}X_3X_4 + A_{35}X_3X_5 + A_{45}X_4X_5$$

Equação 4

(*) onde as variáveis são X1 (massa em gramas), X2 (tempo de extração em minutos), X3 (ciclos de extração), X4 (temperatura de extração em °C), X5 (flush em %)

Os valores apresentados em negrito, na **Tabela XXIII**, expressam as variáveis ou interações entre variáveis que possuem efeitos significativos ao nível de 5 %.

Ao avaliar os valores de coeficientes considera-se que quando é obtido um valor positivo para um determinado efeito, significa que, um aumento nesta variável, favorece o rendimento de óleo extraído, enquanto, para valores negativos, um aumento no valor da variável indica que há um decréscimo no rendimento do óleo. Por isso pode-se dizer que quando se aumenta de 1 para 3 ciclos de extração com hexano (coeficiente A3) obtém-se um acréscimo de rendimento de 0,63 % do óleo extraído em sementes de uvas, por exemplo.

Tabela XXIII: Coeficientes obtidos da análise de todos os parâmetros utilizados na extração com PLE.

| Coeficientes | Hexano | Hexano/DCM | DCM | Acetato de Etila |
|---------------------|---------------|-------------------|-------------|-------------------------|
| A0 | 9,39 | 10,6 | 11,9 | 8,61 |
| A1 | 0,00 | 0,17 | 1,09 | 0,03 |
| A2 | 0,96 | 1,06 | 1,26 | 0,43 |
| A3 | 0,63 | 0,61 | 1,53 | 0,77 |
| A4 | 1,40 | 0,39 | 1,18 | 1,50 |
| A5 | -0,20 | 0,56 | 0,60 | 0,17 |
| A12 | -0,08 | 0,48 | 1,07 | 0,19 |
| A13 | 0,05 | -0,09 | 1,08 | 0,62 |
| A14 | -0,22 | -0,04 | 0,72 | 0,04 |
| A15 | 0,16 | 0,67 | 0,72 | 0,13 |
| A23 | -0,28 | -0,21 | 0,86 | 0,03 |
| A24 | 0,14 | 0,86 | 0,52 | 0,56 |
| A25 | 0,19 | 0,68 | 0,14 | -0,03 |
| A34 | -0,25 | 0,75 | 0,74 | 0,89 |
| A35 | 0,39 | 0,43 | 0,12 | -0,39 |
| A45 | 0,21 | -0,03 | 1,24 | 0,14 |

A média dos resultados obtidos pelos experimentos, para cada solvente extrator, é apresentada pelos coeficientes A0. Quando esta variável é analisada verifica-se que os melhores rendimentos, em massa, foram obtidos utilizando o DCM como solvente extrator, provavelmente isso seja decorrente do poder de orientação dos dipolos que este solvente possui em relação aos demais, isso faz com que esse solvente extraia tanto compostos polares como apolares. O oposto ocorre para o acetato de etila, que possui uma alta polaridade, mas uma baixa constante dielétrica.

Outro fator importante é a capacidade de difusão que o DCM possui, devido a sua pequena estrutura, esta característica faz com que haja facilidade na entrada nos poros das sementes.

Para os óleos extraídos com hexano as variáveis tempo, número de ciclos e temperatura apresentaram ser significativos, pois apresentaram os maiores efeitos, já para as amostras com hexano/DCM o flush também mostrou ser significativo, porém neste caso os maiores efeitos foram obtidos para o tempo de extração e pela sobreposição das variáveis de tempo e temperatura.

Quando se analisa os resultados das amostras extraídas com DCM observa-se que todas as variáveis são significativas e que com exceção do flush todas apresentam um acréscimo maior que 1 %, quando aumentado do menor para o maior nível das variáveis.

Por outro lado as amostras extraídas com acetato de etila apresentaram, praticamente, as mesmas variáveis significativas que o planejamento experimental com hexano. A diferença está na intensidade destes fatores e na ordem de disposição, sendo que neste caso a temperatura (1,50), o número de ciclos (0,773) e o tempo (0,428), respectivamente, seguem uma ordem decrescente de intensidade de efeito sobre o rendimento.

Apesar dos quatro planejamentos apresentarem diferenças entre os fatores significativos, pode-se constatar que o tempo, o número de ciclos e a temperatura sempre são fatores significativos e auxiliam para o acréscimo de rendimento nas extrações. Outro fator importante é que à medida que se aumenta a quantidade de DCM para a extração também aumenta o número de efeitos significativos em cada planejamento.

Ao avaliar os coeficientes A2 (tempo) de cada planejamento experimental pode-se verificar que a intensidade destes, é dada na seguinte ordem crescente: acetato de etila < hexano < solução de hexano:DCM < DCM, o resultado desta variável mostra que quanto maior o tempo maior é capacidade de difusibilidade do solvente nos poros da amostra, como o solventes possuem estruturas diferentes é fácil entender que solventes menores terão um acesso mais rápido que solventes de maior volume.

O estudo mostrou que se o solvente passar mais de uma vez pela amostra existe uma tendência de uma maior extração do óleo de semente de uva,

provavelmente isso ocorra pelo fato de aumentar a capacidade de transferência de massa, esse processo é análogo a outros métodos de extração, como o Soxhlet.

A temperatura foi uma variável importante no acréscimo de rendimento das extrações, que mostraram que a 100°C há uma maior extração dos analitos. Com o aumento da temperatura há um aumento da capacidade dos solventes solubilizar os analitos, devido ao enfraquecimento das pontes de hidrogênio entre a matriz e os analitos, além disso, há uma maior penetrabilidade dos solventes nos poros da matriz devido ao decréscimo de viscosidade e a tensão superficial do solvente.

O estudo das principais influências que as variáveis apresentaram em cada planejamento experimental, com diferentes solventes extratores, será apresentado nos próximos itens:

a) análise das variáveis para as extrações com hexano

Os valores dos coeficientes indicam que a variável com maior efeito (1,40 %) é a temperatura. As variáveis X3 (ciclos) e X2 (tempo de extração) manifestaram efeitos positivo 0,630 % e 0,964 %, respectivamente, porém de menor intensidade. Este resultado indica que quando se aumenta o tempo de extração ou número de ciclos de extração há também um acréscimo de rendimento na extração do óleo.

A interação das variáveis X3 (ciclos) e X5 (*flush*) promove um acréscimo de rendimento na ordem de 0,393 %. Embora o efeito desta interação seja positivo, é inferior ao conseguido pelas variáveis X2, X3 e X5 isoladamente. As demais interações entre as variáveis não mostram efeitos significativos para as amostras extraídas com hexano.

b) análise das variáveis para as extrações com solução de hexano:DCM (1:1)

A variável X2 (tempo) apresentou o maior efeito (1,07 %) para o aumento do rendimento das amostras extraídas com a solução de hexano:DCM (1:1),

indicando que 10 minutos não são suficientes para a extração de todo o óleo da amostra e que há uma tendência de acréscimo de 1 % de óleo ao extrair as amostras com 30 minutos. As variáveis X3 (ciclos), X5 (*flush*) e X4 (temperatura) também obtiveram efeitos positivos em ordem decrescentes de importância 0,61 %, 0,56 % e 0,39 %, respectivamente.

Quando o efeito das interações entre X1 (massa) e X5 (*flush*) ou X2 (tempo) e X5 (*flush*) são estudadas verifica-se que ocorrem efeitos positivos semelhantes, o que significa que em qualquer uma destas situações obtemos um aumento, aproximado, de 0,6 % no rendimento do óleo extraído. Outras variáveis possuem interações significativas para a extração do óleo de semente de uva, como, por exemplo, a interação de X3 (ciclos) e X5 (*flush*) que apresenta um aumento de rendimento de 0,43 % quando estas duas variáveis atuam em conjunto.

Porém as inter-relações das variáveis X3 e X4 (ciclos e temperatura) e X2 e X4 (tempo e temperatura) apresentaram efeitos positivos significativos superiores até então encontrados para a relação entre duas variáveis. Os valores 0,75 e 0,86, respectivamente, para cada uma destas relações demonstra que a temperatura atua de forma conjunta com o tempo e com o número de ciclos para um maior rendimento da extração.

c) análise das variáveis para as extrações com DCM

Em extrações com DCM verifica-se que todas as variáveis independentes promovem efeitos significativos positivos e que com exceção da inter-relação entre a variável X3 e a variável X5 todos os efeitos encontrados da relação entre duas variáveis também são significativos positivamente. Contudo, quando se estuda cada caso isoladamente, a variável X3 apresenta um aumento de 1,53 % de rendimento quando aumentamos de um para três ciclos de extração. Este aumento de rendimento de extração é referente ao número de vezes em que o solvente passa pela amostra para extrair os compostos. Este efeito já foi observado em extrações líquido - líquido e sólido – líquido [139].

As outras variáveis tiveram seus efeitos de menor intensidade, 1,10 % (X2), 1,26 % (X3), 1,18 % (X4) e 0,600 % (X5), porém continuaram a mostrar valores significativos para o aumento de rendimento ao longo do planejamento.

A interação X4X5 apresentou 1,23 % de aumento no rendimento, seguidas da relação de X1X3 e X1X4 que produziram valores semelhantes e próximos a 1,07. Estas últimas interações são interessantes pelo fato de ser o único planejamento experimental que mostrou a variável massa como uma variável significativa, demonstrando assim uma maior capacidade de extração do solvente.

d) análise das variáveis para as extrações com acetato de etila

As extrações do planejamento experimental 2^{5-1} com acetato de etila mostraram resultados pouco satisfatórios, sendo este solvente o que apresentou o menor resultado em termos de extração.

As variáveis que se mostraram significativas para este planejamento foram as mesmas para as extrações com hexano, X2 (tempo), X3 (ciclos) e X4 (temperatura). A temperatura também foi a principal variável mostrando um efeito de 1,50 % de rendimento quando se aumenta do nível mínimo da variável ao máximo.

A inter-relação entre X3 e X4 mostrou efeito significativo positivo (0,89) seguidos da relação entre X1X3 e X2X4, que apresentaram 0,62 % e 0,55 %, respectivamente. Porém verifica-se que também existe um efeito negativo quando se relaciona a variável X3 (ciclos) com a variável X5 (flush) (-0,387) o que não acontece em outros solventes estudados.

4.1.2.2.1 ANÁLISE DOS RESÍDUOS

Ao processar os resultados e discriminar somente os fatores dos coeficientes significativos obtemos um modelo experimental simplificado para cada solvente extrator, através do coeficiente de correlação gerado pelo modelo pode-se verificar se o modelo criado está ou não ajustado aos dados experimentais. As

Equações 5, 6, 7, 8 expressam os modelos criados para as extrações em hexano, solução de hexano:DCM (1:1), DCM e acetato de etila, respectivamente, por PLE.

$$R(\%) = A0 + A2X2 + A3X3 + A4X4 + A35X3X5 \quad \text{Equação 5}$$

$$R(\%) = A0 + A2X2 + A3X3 + A4X4 + A5X5 + A15X1X5 + A24X2X4 + A25X2X5 + A34X3X4 + A35X3X5 \quad \text{Equação 6}$$

$$R(\%) = A0 + A1X1 + A2X2 + A3X3 + A4X4 + A5X5 + A12X1X2 + A13X1X3 + A14X1X4 + A15X1X5 + A23X2X3 + A24X2X4 + A34X3X4 + A45X4X5 \quad \text{Equação 7}$$

$$R(\%) = A0 + A2X2 + A3X3 + A4X4 + A13X1X3 + A24X2X4 + A34X3X4 + A35X3X5 \quad \text{Equação 8}$$

(*) onde as variáveis são: X2 (tempo de extração em minutos), X3 (ciclos de extração), X4 (temperatura de extração em °C), X5 (flush em %)

A partir de cada equação realizou-se a análise da relação entre os valores obtidos experimentalmente e os valores estimados através do modelo, a diferença entre o experimental e o modelo proposto, é dado através do resíduo. A **Figura 15** apresenta a comparação gráfica para os resíduos com hexano, solução de hexano:DCM, DCM e acetato de etila por PLE, conforme os dados da **Tabela XXII**.

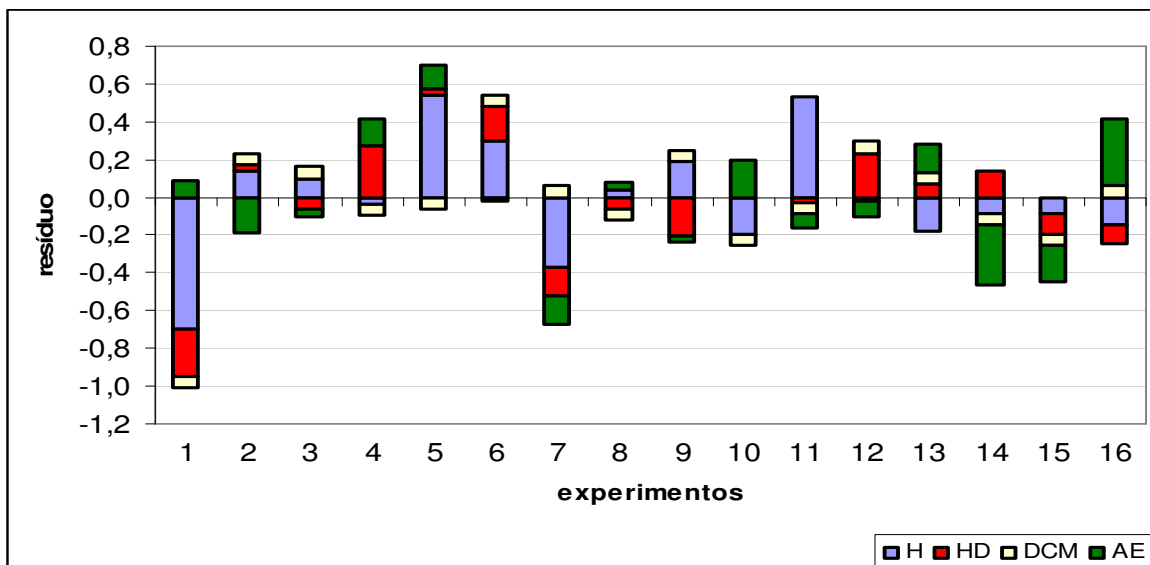


Figura 15: Comparação gráfica entre os resultados de resíduos obtidos com hexano, hexano:DCM, DCM e Acetato de Etila (**Tabela XXIII**) em PLE para o planejamento semi-fatorial 2^{5-1} .

Os experimentos H1 e H11 apresentaram os maiores resíduos entre os experimentos com hexano, ou seja, a maior diferença entre o valor experimental e o teórico, o que indica que o modelo é menos adequado para estes experimentos.. Porém nenhuma das amostras apresentou resíduos superiores 0,65. O modelo proposto para os experimentos com hexano também foi o que apresentou maior resíduo dentre os planejamentos experimentais.

A correlação entre o modelo proposto para as extrações, com a solução hexano:DCM (1:1), e os valores experimentais apresentou coeficiente 0,99, muito próximo a 1, o que mostra a similaridade existente entre os valores experimentais e teóricos.

Através da análise geral destes dados (**Tabela XXIII** e **Figura 15**) pode-se verificar que as amostras HD-4 e HD-12 apresentam os maiores valores de resíduo, porém estes valores são pequenos (0,27 e 0,23, respectivamente). As demais amostras apresentam resíduos inferiores a 0,2.

Para a construção do modelo (**Equação 7**) em amostras extraídas com DCM, verificou-se que, salvo a combinação de variáveis X2X5, as demais variáveis são significativas e não podem ser retiradas para a construção de um

modelo mais simplificado. Através deste modelo foi possível analisar a diferença entre o modelo teórico e os dados experimentais, cujos valores são comparados na **Figura 15** que mostra que o resíduo não possui valores superiores a 0,13, por isso pode-se dizer que todos os valores do modelo estão muito bem adequados ao resultados experimentais sugerido para as amostras extraídas com DCM. Isso é confirmado com o coeficiente de correlação de 0,99.

A análise dos resultados obtidos com acetato de etila foi também expressa sob a forma de equação (**8**). Na **Figura 15** são encontrados valores de resíduos inferiores a 0,2 e coeficiente de correlação 0,99 o que indica que o modelo está adequado as amostras extraídas com esse solvente.

Embora a amostra 16 do planejamento experimental com acetato de etila também apresente o maior rendimento de todo o planejamento, também é o que apresenta maior resíduo, demonstrando que o modelo proposto é menos adequado para este experimento.

4.1.2.2.2 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO APLICADA A SEMENTES DE DIFERENTES VARIEDADES DE UVA

Na indústria de óleos o solvente mais utilizado é o hexano, por isso, mesmo não tendo oferecido os melhores resultados, foi necessário realizar as extrações com as demais amostras de sementes de uvas com este solvente a fim de comparar com métodos clássicos de extração. Os resultados destas extrações estão apresentados na **Tabela XXIV**:

As condições utilizadas para a extração das variedades citadas, foram 3 g de semente de uva moída em 3 ciclos com 30 minutos de extração à 100°C e com 150 % de flush, considerada a melhor condição para PLE nas análises anteriores com a mistura de sementes Isabel/Herbemont.

Tabela XXIV: Extrações de sementes de uvas em hexano utilizando PLE na melhor condição do planejamento experimental.

| amostras | rendimento (% m/m) (*) |
|------------------|-------------------------------|
| Herbemont/Isabel | 10,9 ± 0,25 |
| Seibel/Isabel | 10,9 ± 0,14 |
| Isabel | 8,29 ± 1,05 |
| Cabernet | 8,54 ± 0,99 |
| Moscatel | 12,2 ± 0,17 |
| Merlot | 11,9 ± 0,81 |

(*)Resultados obtidos em duplicata.

Os resultados obtidos das extrações com PLE mostraram que as diferentes variedades de sementes de uvas apresentaram rendimentos semelhantes as extrações com Soxhlet e prensagem. A semente de uva da variedade Isabel apresentou um rendimento inferior, confirmando os resultados obtidos por outros métodos de extração.

Através dos resultados obtidos com o planejamento experimental realizado anteriormente é possível sugerir que quando utilizados outros solventes, como DCM, obtém-se maiores rendimentos de óleo com estas variedades de sementes de uva.

4.1.2.3 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE)

Para a extração com fluido supercrítico foram realizadas somente extrações com a mistura das variedades Isabel e Herbemont. O óleo desta amostra foi extraído utilizando dióxido de carbono como fluido extrator, no estado sub e supercrítico e, posteriormente, com propano e solventes modificadores. As condições de extração com CO₂, assim como os rendimentos obtidos estão apresentados na **Tabela XXV** e na **Figura 16** através da coleta de frações de 20 em 20 minutos ao longo da extração. Apesar de utilizarmos CO₂ em condições subcríticas e supercríticas, os experimentos foram todos classificados como SFE.

O correto seria chamar tais experimentos de Extração com Fluidos Pressurizados, mas isto poderia causar alguma confusão com os resultados de PLE.

Tabela XXV: Extrações realizadas com fluxo de 2 mL min⁻¹ com CO₂ como solvente supercrítico para a amostra da mistura das variedades Isabel e Herbemont

| condição | temperatura(°C) | pressão (bar) | densidade reduzida | rendimento (%) |
|---------------------|-----------------|---------------|--------------------|----------------|
| CO ₂ - 1 | 30 | 110 | 1,70 | 3,52 |
| CO ₂ - 2 | 45 | 181,6 | 1,70 | 6,38 |
| CO ₂ - 3 | 60 | 254 | 1,70 | 7,92 |
| CO ₂ - 4 | 45 | 108 | 1,10 | 0,68 |
| CO ₂ - 5 | 45 | 118,4 | 1,40 | 1,75 |
| CO ₂ - 6 | 45 | 250 | 1,85 | 7,83 |
| CO ₂ - 7 | 45 | 60 | 0,83 | 0,56 |

Amostras que foram extraídas em uma mesma densidade reduzida, porém em temperatura e pressão diferentes, apresentaram rendimentos diferenciados, indicando que a densidade reduzida não atua como fator isolado. O mesmo ocorre quando se trabalha com a mesma temperatura, porém pressão e densidade reduzida distinta.

Os resultados, descritos na **Tabela XXV**, indicam que o maior rendimento na extração do óleo das sementes de uvas com CO₂ foram apresentados nas condições 6 e 3 e que, nestas condições, o aumento da densidade reduzida provocado pelo acréscimo de 15°C não foi suficiente para obter um rendimento superior a 8%.

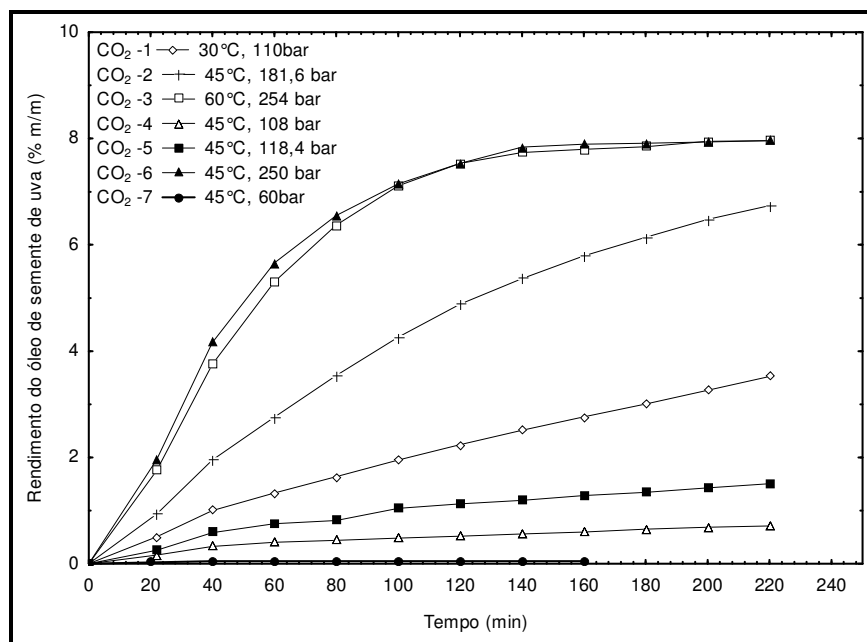


Figura 16: Variação do rendimento com o tempo para extrações subcríticas e supercríticas realizadas com CO₂, em diferentes condições de temperatura, densidade reduzida e pressão, para a amostra de sementes de uva tipo Isabel e Herbemont.

Quando se trabalha com condições de densidades reduzidas menores que 1,7 (experimentos 4, 5 e 7, **Tabela XXVI**) obtemos os menores rendimentos de óleo de sementes de uva em CO₂ como fluido supercrítico. Quando a temperatura de extração está acima do seu ponto crítico, tem-se o poder de difusibilidade aumentado, o mesmo ocorre com a solvatação devido ao seu aumento de pressão.

Na condição 1, verifica-se que mesmo tendo densidade reduzida (1,7) muito próxima, às condições de maior rendimento (3 e 6), não se obteve o mesmo resultado, o que se deve, provavelmente, à baixa temperatura de extração (30°C) que compete com os efeitos de densidade. A temperatura neste caso atua diminuindo a difusibilidade do CO₂ e aumentando a viscosidade, não deixando que ocorra uma extração mais eficiente.

Quando comparado os resultados dos experimentos (2, 4, 5, 6 e 7) com mesma temperatura podemos observar que a medida que se aumenta o efeito da

densidade existe uma maior extração do óleo devido a maior solvatação dos analitos presentes na amostra.

Na seqüência dos experimentos de SFE, foi usado propano como fluido extrator. Os rendimentos para as extrações com propano estão apresentados na **Figura 17**, através da coleta de pontos de 1 em 1 minuto até 5 minutos e de 10 em 10 minutos até o final de 30 minutos de extração.

A amostra de semente de uva (mistura do tipo Isabel e Herbemont) também foi extraída com propano como solvente na região subcrítica. Embora este solvente não seja muito utilizado em escala industrial apresentou resultados superiores para extração de óleo de sementes de uvas, comparado com as extrações realizadas com CO₂.

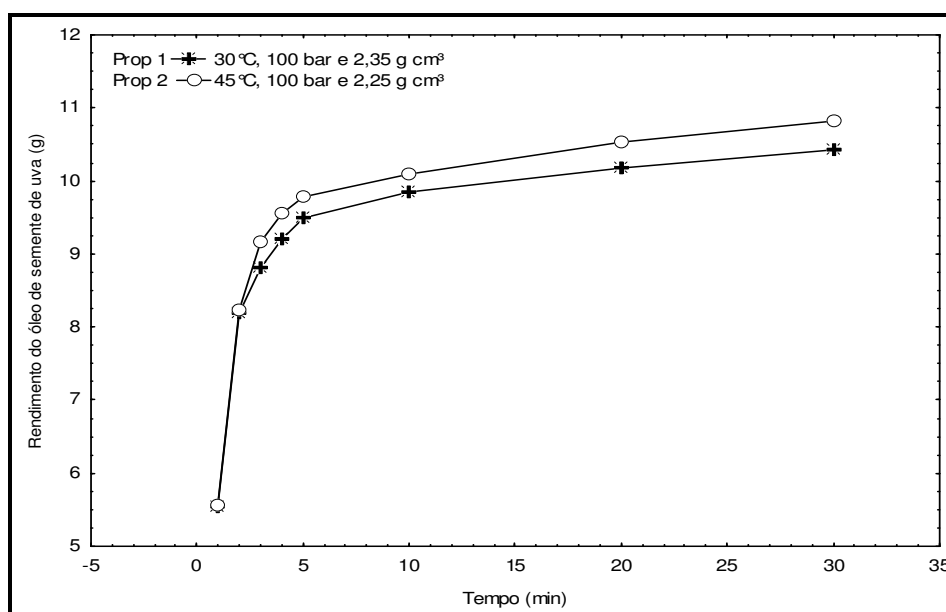


Figura 17: Variação do rendimento com o tempo para extrações subcríticas e supercríticas realizadas com propano, em diferentes condições de temperatura, densidade reduzida e pressão, para a amostra de sementes de uva tipo Isabel e Herbemont.

As extrações realizadas com propano em mesma pressão e densidades reduzidas semelhantes mostram um pequeno acréscimo quando se aumentou a temperatura de 30°C para 45°C. Sabendo que as condições críticas de pressão e

temperatura para o propano são 97°C e 41,8 bar, respectivamente, pode-se dizer que as extrações da amostra ocorreu na região subcrítica.

Os resultados indicam que para a extração de óleo de semente de uva, utilizando propano como solvente, o processo poderá ser empregado com pressões e temperaturas menores, proporcionando menor custo de operação. Além de ser um solvente que como o CO₂ não necessita de uma etapa de evaporação do solvente.

Extrações em baixas temperaturas são interessantes para obter produtos enriquecidos em compostos minoritários como proteínas, vitaminas e outros compostos antioxidantes que são sensíveis a variações de temperatura. Estes produtos, geralmente possuem um grande valor agregado devido à maior qualidade.

Pode-se comparar os resultados para a melhor condição com CO₂ (experimento 3; T = 60°C; P = 254 bar e $\rho = 1,7$) com a melhor condição com propano (experimento 2; T = 45°C; P = 100 bar e $\rho = 2,25$) através das **Figuras 16 e 17**. Pode-se, então, avaliar que o propano é melhor solvente extrator que o CO₂ para óleo de semente de uva. Isto provavelmente se deve à solubilidade seletiva que o CO₂ tem com compostos lipofílicos de baixo peso molecular (abaixo de 500 Daltons) como ácidos graxos livres, ésteres, monoglicerídeos e alguns diglicerídeos. Contudo na composição da amostra existe uma grande quantidade de triacilglicerol os quais têm menor solubilidade neste solvente. Por esta razão, 30 minutos de extração com propano foram suficientes para superar o rendimento de 220 minutos com CO₂.

4.1.2.3.1 EXTRAÇÃO COM FLUÍDO SUPERCRÍTICO COM SOLVENTES MODIFICADORES EM CO₂

Para explorar todos os recursos disponíveis dentro da extração supercrítica e poder comparar com os óleos extraídos com outros métodos de extração como PLE, uma amostra de sementes de uva (mistura Isabel/Herbemont) foi extraída com adição de 10 % de solventes modificadores em CO₂. Os

solventes utilizados e suas principais propriedades estão apresentados na **Tabela XXVI**.

Tabela XXVI: Propriedades dos solventes modificadores usados na SFE (CO₂)

| propriedades | solventes | | | |
|------------------------------|-----------|------|-------|-------|
| | H | DCM | AE | MeOH |
| ponto de ebulição (°C) | 68,7 | 40,7 | 77,1 | 67,4 |
| índice de refração (20 °C) | 1,37 | 1,42 | 1,372 | 1,33 |
| constante dielétrica (25 °C) | 1,88 | 8,93 | 6,02 | 32,63 |
| pressão crítica (atm) | 29,5 | 61,5 | 37,8 | 79,86 |
| temperatura crítica (°C) | 234,8 | 245 | 250,1 | 240 |

(*) solventes : (H) hexano, (DCM) diclorometano, (AE) acetato de etila e (MeOH) metanol [64].

O uso de solventes modificadores é realizado para aumentar o rendimento da extração, retirando um maior número de compostos que não são solúveis no solvente principal. Geralmente, usam-se solventes polares em extrações com CO₂ devido à baixa polaridade deste solvente.

A solubilidade de compostos, contendo elementos como oxigênio e nitrogênio, pode ser aumentada quando se têm solventes capazes de realizar pontes de hidrogênio. Hidrocarbonetos (hexano) possuem baixa capacidade de formar pontes de hidrogênio, assim como o diclorometano, que é classificado segundo Burrell [79], como um solvente pobre. Já o acetato de etila é classificado como solvente moderado e o metanol, por sua vez, por possuir uma maior tendência de formar pontes de hidrogênio, classifica-se como um solvente forte.

A **Tabela XXVII** apresenta as condições e os resultados para a SFE com CO₂ e com solventes modificadores e a **Figura 18** apresenta estes resultados de forma gráfica para melhor visualização dos efeitos.

Tabela XXVII: Resultados e condições para as extrações do óleo de semente de uva utilizando SFE com CO₂ e 10% dos solventes modificadores na pressão de 181 bar e temperatura de 45°C.

| solvente modificador | fluxo de CO ₂ (mL min ⁻¹) | fluxo de solvente modificador (mL min ⁻¹) | R% (m/m) |
|----------------------|--|---|----------|
| hexano | 0,49 | 1,51 | 9,51 |
| hexano/DCM | 0,36 | 1,64 | 9,63 |
| DCM | 0,28 | 1,72 | 8,89 |
| acetato de etila | 0,39 | 1,61 | 11,1 |
| metanol | 0,18 | 1,82 | 11,4 |

R(%) = rendimento em massa.

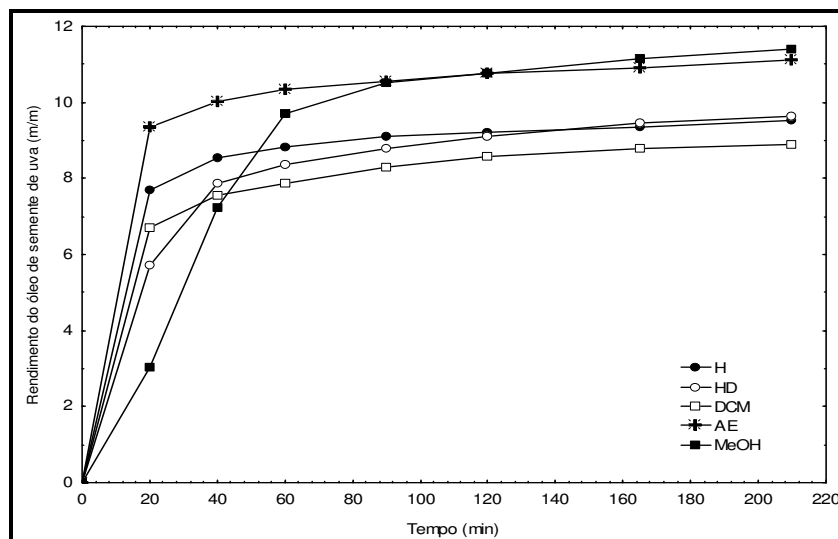


Figura 18: Variação do rendimento com o tempo para extrações supercríticas realizadas com CO₂ e adição de 10 % de solventes modificadores na pressão de 181 bar e temperatura de 45°C, para a amostra de sementes de uva tipo Isabel e Herbemont.

Estes resultados demonstram que o rendimento em massa dos óleos extraídos foi maior para o metanol (chegando a 11,4 %), seguido do acetato de etila (11,1 %), solução hexano:DCM (9,63 %) e o menor rendimento foi obtido com o DCM (8,89 %).

A extração com hexano chega a 9,51 % e, mesmo não sendo o solvente que tem maior rendimento, nos primeiros 100 minutos a quantidade de óleo extraída é maior que com DCM e com solução de hexano/DCM. O mesmo acontece quando é analisado o comportamento do acetato de etila.

O acetato de etila mostrou um bom rendimento de óleo extraído em relação aos demais solventes. Quando são estudadas as características dos solventes (**Tabela XXVII**) verifica-se que o acetato de etila apresenta menor constante dielétrica que o diclorometano, provavelmente devido à sua menor capacidade de orientar seus dipolos, tendo por isso maior tendência de extrair compostos lipofílicos que o DCM.

Ao analisar o poder solvente da mistura de hexano/DCM (1:1 v/v) verifica-se que a quantidade de hexano presente nesta mistura não foi suficiente para a extração de todos os compostos da amostra, o DCM é capaz de extrair compostos mais polares.

A curva de rendimento obtida para a extração com metanol mostra um comportamento atípico em relação aos demais solventes. Este solvente extrai menos nos primeiros 60 minutos e somente após os 140 minutos ultrapassa o rendimento com acetato de etila. Provavelmente, isso é devido à grande quantidade de compostos apolares presentes no óleo, o metanol somente é capaz de solubilizar os triacilglicerol e ácidos graxos quando há possibilidade de formar pontes de hidrogênio com os mesmos.

As extrações com solventes modificadores mostraram que o melhor rendimento foi conseguido utilizando o solvente mais polar, porém este solvente é muito tóxico. Como alternativa de solventes polares optou-se por fazer um estudo utilizando o etanol como solvente modificador sendo este recomendado pela FDA (*Food and Drugs Agency*). Este estudo visa avaliar a mínima quantidade de solvente em um método de extração nas mesmas condições de temperatura (45°C) e pressão (181 bar) com CO₂. Os resultados obtidos utilizando o etanol como solvente estão expressos na **Tabela XXVIII** e representados na **Figura 19**.

Tabela XXVIII: Resultados e condições para as extrações do óleo de semente de uva utilizando SFE com CO₂ e etanol como solvente modificador na pressão de 181 bar e temperatura de 45°C.

| exp. | SMOD (%) (*) | fluxo de CO ₂ (mL min ⁻¹) | fluxo de etanol (mL min ⁻¹) | % (m/m) |
|--------|--------------|--|---|---------|
| Et - 1 | 3 | 1,92 | 0,08 | 7,97 |
| Et - 2 | 5 | 1,87 | 0,13 | 7,83 |
| Et - 3 | 10 | 1,74 | 0,26 | 9,88 |
| Et - 4 | 15 | 1,62 | 0,38 | 10,6 |
| Et - 5 | 20 | 1,50 | 0,50 | 10,4 |

(*) SMOD = percentual de solvente modificador adicionado

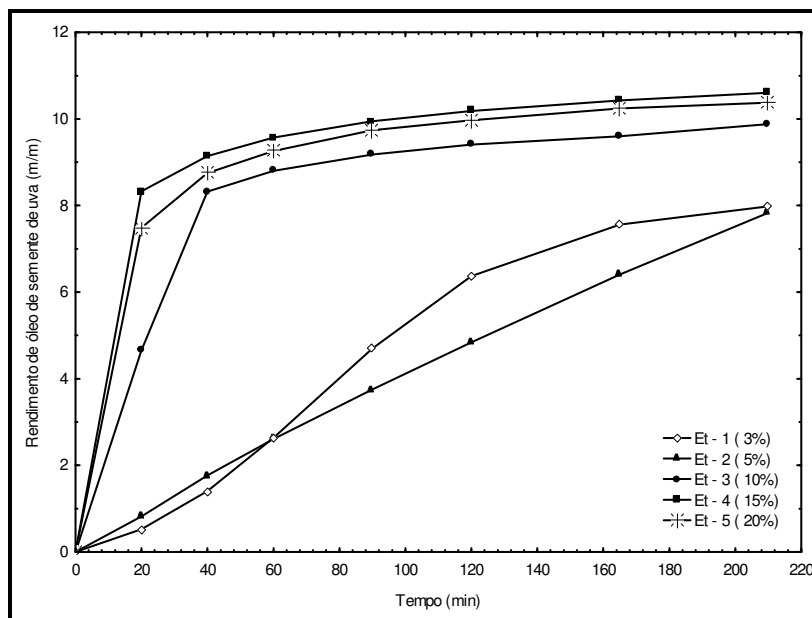


Figura 19: Variação do rendimento com o tempo para extrações supercríticas realizadas com CO₂ e adição de etanol como solvente modificador na pressão de 181 bar e temperatura de 45°C, para a amostra de sementes de uva tipo Isabel e Herbemont.

Ao extrair a amostra com 10 % de etanol, a 45°C e 181 bar (condição 3), verificou-se um rendimento de 9,88 %. Este resultado foi menor comparado ao obtido com metanol nas mesmas condições (11,40 %).

As condições 4 (15 %) e 5 (20 %) apresentaram rendimentos semelhantes, 10,6 % e 10,4 %, respectivamente, o que indica que, acima de 15 % de solvente modificador, não há nenhum acréscimo no rendimento de óleo extraído.

Os resultados mostrados na **Figura 19** indicam que adição de até 5 % de solvente modificador não é suficiente para a total extração do óleo de semente de uva da mistura das variedades Isabel e Herbemont. Quando a extração do óleo é acompanhada, ao longo do experimento, verifica-se que o óleo é extraído à medida que o solvente entra em contato com os compostos dentro dos poros da semente. O mesmo não ocorre quando se coloca um excesso de etanol (≥ 10 %).

4.2 ANÁLISES QUALITATIVA E QUANTITATIVA DOS ÓLEOS DE SEMENTES DE UVA ISABEL/HERBEMONT OBTIDOS PELOS DIFERENTES PROCESSOS DE EXTRAÇÕES ESTUDADAS NESTE TRABALHO

4.2.1.1 ANÁLISE QUALITATIVA DOS ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS

Foram analisados dois tipos de óleos de semente de uva comerciais: um comestível (Borges) e outro usado para fins de produção de cosméticos e farmacêuticos (Ipiranga). Os cromatogramas para a análise qualitativa inicial dos AGT nos óleos extraídos serão apresentados apenas com a técnica de prensagem, uma vez que não ocorreram diferenças qualitativas consideráveis para os outros métodos de extração.

A maioria dos compostos presentes nos óleos vegetais são ésteres de ácidos graxos ligados ao glicerol. Essa fração possui concentração de aproximadamente 95 % do total dos compostos. Esses compostos podem ser caracterizados após o procedimento de saponificação. Para a análise qualitativa e quantitativa da fração saponificável realizou-se o procedimento descrito na parte experimental **Seção 3.6.3.1**, página 49. A **Figura 20** apresenta os cromatogramas referentes às amostras de óleos de sementes de uva derivatizados com BF_3 em

metanol. A identificação dos compostos majoritários nesta **Figura** está apresentada na **Tabela XXX**.

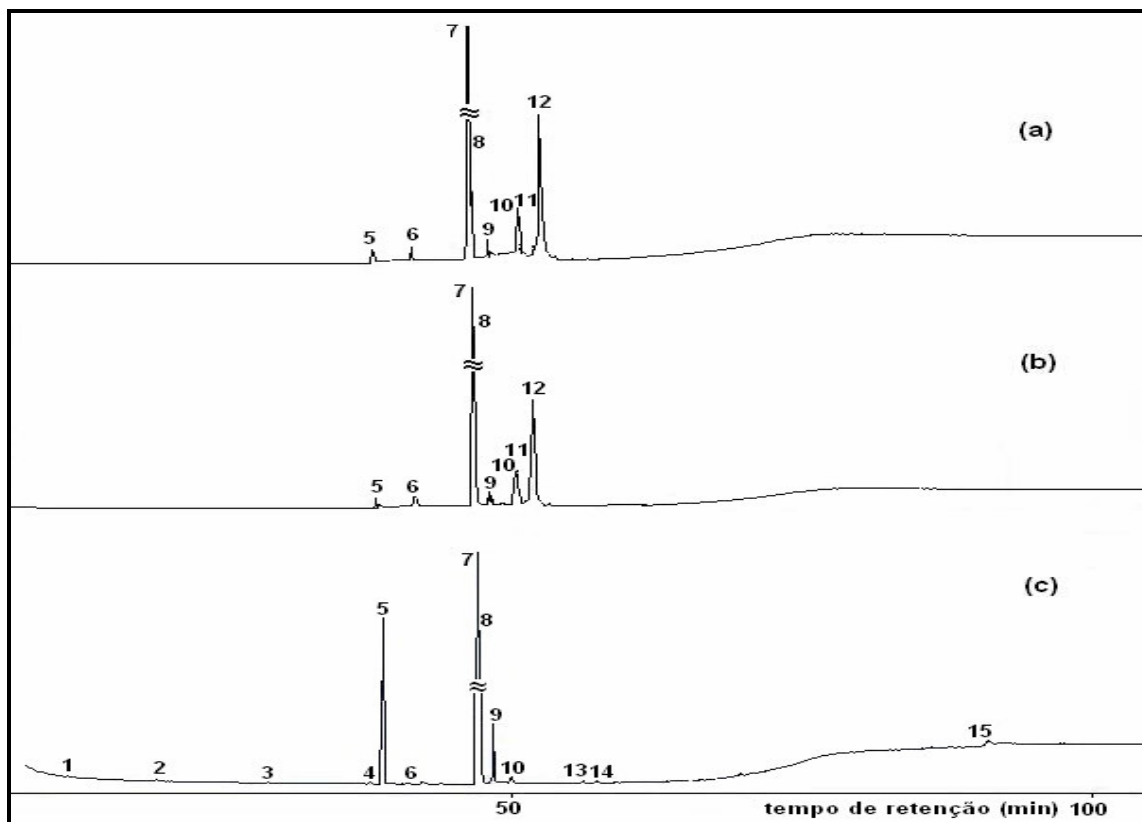


Figura 20: Cromatogramas do Íon Total das amostras de óleo de semente de uva derivatizadas com BF_3 em metanol: (a) óleo Borges, (b) óleo Ipiranga e (c) óleo de prensagem de semente de uva Isabel/Herbemont.

Condições cromatográficas descritas na parte experimental (Seção 3.6.3.1) e identificação dos picos de acordo com a Tabela XXX

Tabela XXIX: Identificação dos compostos presentes no óleo de semente de uva representado na **Figura 20**.

| pico | fórmula | nome |
|------|-------------------|------------------------|
| 1 | $C_{11}H_{22}O_2$ | caprato de metila |
| 2 | $C_{13}H_{26}O_2$ | laurato de metila |
| 3 | $C_{15}H_{30}O_2$ | miristato de metila |
| 4 | $C_{17}H_{32}O_2$ | palmitoleato de metila |
| 5 | $C_{17}H_{34}O_2$ | palmitato de metila |
| 6 | $C_{18}H_{36}O_2$ | palmitato de etila |
| 7 | $C_{19}H_{34}O_2$ | linoleato de metila |
| 8 | $C_{19}H_{36}O_2$ | oleato de metila |
| 9 | $C_{19}H_{38}O_2$ | estearato de metila |
| 10 | $C_{20}H_{36}O_2$ | linoleato de etila |
| 11 | $C_{20}H_{38}O_2$ | oleato de etila |
| 12 | $C_{20}H_{40}O_2$ | estearato de etila |
| 13 | $C_{21}H_{42}O_2$ | araquidato de metila |
| 14 | $C_{25}H_{50}O_2$ | lignocerato de metila |
| 15 | $C_{28}H_{48}O_2$ | brassicasterol |

Observando a **Figura 20**, verificam-se somente compostos como ácidos graxos são identificados. Além disso, pode ser sugerido que o ácido linoléico e oléico (picos 7 e 8) são encontrados em quantidades superiores aos demais compostos, visto que a intensidade do sinal apresentada no cromatograma é bem superior aos demais compostos.

Além dos ácidos graxos, apresentados aqui como ésteres metílicos, alguns ésteres etílicos como, o linoleato de etila, o oleato de etila e o estearato de etila foram identificados nas amostras analisadas.

O brassicasterol (pico 15) foi identificado somente na amostra de óleo bruto extraído por prensagem. A presença de apenas um fitosterol (brassicasterol) sugere que a maioria dos fitosteróis presentes no óleo de semente de uva esteja presente na fração de compostos de insaponificáveis.

4.2.1.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS

A análise quantitativa dos ácidos graxos totais foi realizada nos óleos da mistura das sementes Isabel/Herbemont extraídas por Soxhlet, prensagem, PLE e SFE. Também foram quantificados os ácidos graxos totais das amostras comerciais, para fins de comparação. As análises foram analisadas em duplicata e valor representado é a média dos resultados obtidos.

A análise quantitativa dos óleos foi realizada como descrito no **Seção 3.5.1** (página 48) da parte experimental. Com esse procedimento os ácidos graxos livres e os ácidos graxos ligados ao glicerol que tenham sofrido saponificação foram derivatizados com uma solução de BF_3 em metanol 12 % e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas no modo SIM, o qual aumenta a sensibilidade e é seletivo para os compostos de interesse.

4.2.1.2.1 ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA COMERCIAIS E OBTIDOS POR MÉTODOS CLÁSSICOS (PRENSAGEM E SOXHLET)

Primeiramente foram quantificados os AGT nos dois óleos comerciais e nos óleos obtidos por métodos clássicos de extração (prensagem e Soxhlet) da mistura de sementes de uva das variedades Isabel e Herbemont.

A **Figura 21** apresenta um exemplo de cromatograma obtido para o óleo de semente de uva extraído por prensagem (da mistura de sementes Isabel/Herbemont) e um cromatograma da mistura de padrões utilizados na quantificação de ácidos graxos totais em óleo de semente de uva. Os demais cromatogramas obtidos apresentaram-se semelhantes a este, de forma que não serão apresentados aqui.

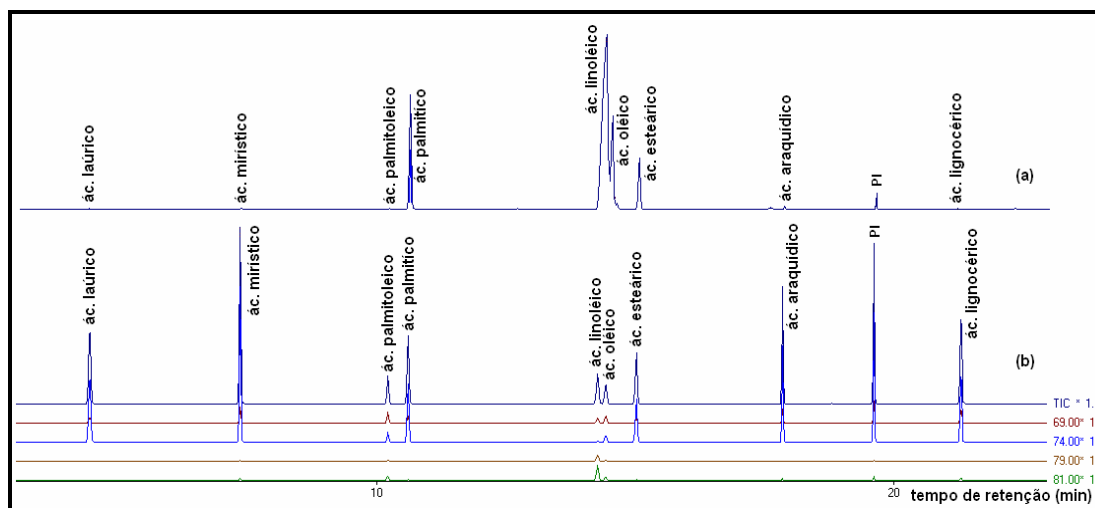


Figura 21: Cromatogramas (GC/MS – modo SIM) para a quantificação de AGT (a) óleo obtido por prensagem de sementes de uva da mistura de Isabel e Herbemont e (b) dos padrões utilizados para quantificação dos AGT na forma de ésteres metílicos.

Condições de análise estão descritas na **Seção 3.5.1, página 48**.

Os resultados quantitativos estão apresentados na **Tabela XXX**. Os óleos comerciais são provenientes de uvas da variedade *Vitis vinífera* e estão dentro do regulamentado estabelecido pela ANVISA (**Tabela III, página 9**) para produto com fins alimentícios.

Através da análise dos dados observa-se que os óleos comerciais estão dentro da faixa limite especificada pela ANVISA. A presença de ácidos graxos insaturados como linoléico e oléico compreendem cerca de 85 % da composição do óleo de sementes de uva comercializado no Brasil tanto para fins farmacêuticos como para fins alimentícios.

Resultados transcritos do certificado de análise, fornecidos pela empresa importadora do óleo de semente de uva B, indicam que cerca de 88 % do total dos ácidos graxos são formados pelos ácidos linoléico e oléico. O certificado de análise apresentou também a quantificação dos outros ácidos graxos, palmítico (6,4 %), palmítico (0,1 %), oléico (16,4 %), linoléico (72,5 %), esteárico (3,8 %), linolênico (0,3 %) e araquídico (0,2 %).

Tabela XXX: Quantificação de ácidos graxos totais em óleo de semente de uva (comercial e extraído por prensagem e Soxhlet da mistura de sementes de uva Isabel e Herbemont) e comparação com dados da ANVISA.

| ácidos(*) | composição percentual em massa (%) | | | | | |
|-----------|------------------------------------|------|------------------|---------|--------|---------|
| | comerciais | | Isabel/Herbemont | | ANVISA | |
| | (A) | (B) | prensa | Soxhlet | | |
| C12:0 | láurico | 0,01 | NI | 0,01 | 0,02 | <0,5 |
| C14:0 | mirístico | 0,03 | NI | 0,03 | 0,04 | <0,3 |
| C16:1 | palmitoleico | 0,14 | NI | 0,18 | 0,19 | <1,2 |
| C16:0 | palmítico | 7,43 | 6,91 | 7,82 | 7,99 | 5,5-11 |
| C18:2 | linoléico | 62,6 | 69,8 | 66,4 | 68,2 | 58-78 |
| C18:1 | oléico | 24,6 | 18,7 | 20,8 | 18,9 | 12 a 28 |
| C18:0 | esteárico | 5,31 | 4,37 | 4,52 | 4,51 | 3 a 6 |
| C20:0 | araquídico | 0,06 | 0,21 | 0,12 | 0,12 | <1 |
| C24:0 | lignocérico | NI | NI | 0,01 | 0,05 | <0,1 |

(*) ácidos determinados como seus ésteres metílicos

NI: Não identificado, NA: não analisado, (A) óleo Borges, (B) óleo Ipiranga

Comparando as colunas na **Tabela XXX**, percebe-se que os resultados obtidos para os óleos comerciais são semelhantes ao do óleo de semente de uva Isabel/Herbemont.

As amostras extraídas por prensagem e Soxhlet apresentaram semelhante variação de concentração mássica (expressa em %) para os ácidos graxos majoritários. As médias obtidas dos resultados dos dois métodos de extração foram para o ácido palmítico de $7,9 \pm 0,12$, ácido linoléico de $67,3 \pm 1,26$, para oléico $19,8 \pm 1,40$ e ácido esteárico de $4,51 \pm 0,007$.

Os demais ácidos graxos não apresentaram concentração superior a 0,5 % de cada ácido graxo em separado, estando esses resultados de acordo com os descritos na literatura [13].

4.2.1.2.2 ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA EXTRAÍDOS POR EXTRAÇÃO COM LIQUÍDO PRESSURIZADO

As extrações por PLE foram otimizadas usando um planejamento experimental semi-fatorial 2^{5-1} como visto na parte experimental, **Seção 3.4.2.2**, página 42. As amostras de sementes de uva Isabel/Herbemont foram extraídas nas mesmas condições para quatro solventes distintos: hexano, hexano/DCM (1:1), DCM e acetato de etila. As demais variedades de uvas foram extraídas na condição experimental otimizada (experimento 16: 3 g de amostra, 3 ciclos de extração por 30 minutos a 100°C e com 150 % de flush) com hexano como solvente extrator.

Através dos dados obtidos das extrações com PLE puderam ser analisados os efeitos das variáveis aplicadas ao planejamento experimental sobre a concentração dos quatro ácidos graxos majoritários presentes no óleo de semente de uva. Usou-se a mesma equação definida para a PLE (**Equação 4**, **página 62**). Os valores dos coeficientes que representam a intensidade dos efeitos das variáveis aplicados ao modelo para os ácidos palmítico, linoléico, oléico e esteárico, respectivamente, estão apresentados na **Tabela XXXI**.

Tabela XXXI: Coeficientes do modelo construído para os ácidos graxos majoritários dos óleos extraídos por PLE com diferentes solventes da mistura de sementes de uva das variedades Isabel e Herbemont

| | ácido palmítico | | | | ácido linoléico | | | | ácido oléico | | | | ácido esteárico | | | |
|------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|
| | H | HD | DCM | AE | H | HD | DCM | AE | H | HD | DCM | AE | H | HD | DCM | AE |
| A0 | 7,26 | 7,86 | 7,52 | 8,17 | 67,6 | 65,6 | 67,4 | 65,0 | 20,77 | 21,73 | 20,58 | 21,55 | 3,91 | 4,39 | 4,06 | 4,54 |
| A1 | -0,05 | -0,34 | 0,25 | -0,02 | 0,82 | 0,44 | 0,04 | 0,39 | -0,48 | 0,07 | -0,45 | 0,09 | -0,16 | -0,13 | 0,13 | -0,13 |
| A2 | 0,32 | -0,08 | 0,18 | 0,23 | -0,32 | 0,32 | 0,64 | 0,14 | -0,05 | -0,16 | -0,82 | -0,52 | 0,11 | -0,09 | 0,008 | 0,11 |
| A3 | -0,53 | 0,14 | 0,22 | 0,16 | 0,61 | 0,03 | -0,29 | -0,89 | 0,41 | -0,16 | -0,33 | 0,33 | -0,35 | 0,02 | 0,40 | 0,17 |
| A4 | 0,16 | -0,17 | 0,15 | -0,33 | -0,15 | 0,31 | -0,58 | 0,79 | -0,36 | -0,15 | -0,05 | -0,28 | 0,27 | 0,07 | 0,49 | -0,05 |
| A5 | -0,36 | -0,44 | 0,25 | -0,35 | 0,24 | 0,69 | -0,55 | 0,98 | 0,39 | -0,04 | 0,02 | -0,17 | -0,20 | -0,17 | 0,25 | -0,20 |
| A12 | 0,34 | -0,11 | 0,03 | -0,07 | -0,26 | 0,51 | 0,003 | -0,16 | -0,42 | -0,26 | -0,12 | 0,27 | 0,23 | -0,10 | 0,08 | -0,01 |
| A13 | -0,55 | -0,43 | -0,12 | 0,15 | 0,69 | 0,68 | -0,52 | 0,65 | 0,02 | -0,08 | 0,38 | -0,52 | -0,19 | -0,17 | 0,25 | -0,02 |
| A14 | 0,42 | -0,15 | 0,03 | -0,31 | -0,12 | 0,44 | -0,34 | -0,04 | -0,38 | -0,23 | 0,16 | 0,48 | 0,10 | -0,08 | 0,12 | -0,09 |
| A15 | -0,25 | -0,01 | 0,27 | -0,16 | -0,02 | 0,28 | 0,36 | -0,76 | 0,20 | -0,16 | -0,60 | 0,57 | 0,02 | -0,11 | -0,04 | -0,02 |
| A23 | -0,12 | -0,13 | -0,22 | 0,09 | -0,37 | 0,36 | -0,66 | -0,20 | 0,39 | -0,14 | 0,57 | 0,34 | 0,003 | -0,06 | 0,29 | -0,08 |
| A24 | 0,71 | -0,08 | -0,06 | -0,02 | -1,18 | 0,59 | -0,88 | -0,24 | 0,13 | -0,42 | 0,67 | -0,26 | 0,30 | -0,05 | 0,22 | 0,23 |
| A25 | -0,61 | -0,08 | 0,09 | -0,19 | 1,08 | 0,17 | 0,04 | 0,41 | -0,19 | 0,00 | -0,16 | -0,21 | -0,26 | -0,05 | 0,01 | -0,01 |
| A34 | 0,001 | -0,15 | -0,14 | -0,36 | -0,49 | 0,54 | -0,55 | -0,08 | 0,63 | -0,21 | 0,55 | 0,70 | -0,10 | -0,19 | 0,06 | -0,21 |
| A35 | 0,15 | -0,12 | -0,07 | -0,39 | 0,37 | -0,16 | -0,05 | 0,40 | -0,73 | 0,26 | 0,08 | 0,49 | 0,15 | -0,01 | 0,01 | -0,17 |
| A45 | -0,60 | -0,03 | -0,04 | 0,31 | 1,33 | 0,27 | -0,04 | -0,15 | -0,08 | 0,20 | >0,01 | -0,43 | -0,47 | 0,07 | 0,08 | 0,22 |

A0: média da concentração do analito; A1: massa; A2: tempo de extração; A3: número de ciclos; A4: temperatura; A5: flush. Solventes - H: hexano, HD: hexano/diclorometano, DCM: diclorometano, AE: acetato de etila

a) Ácido Palmítico

Através dos coeficientes **A0** que expressam a média da concentração de cada planejamento experimental, verifica-se que o melhor solvente extrator para o ácido palmítico foi o acetato de etila. Sendo este solvente polar, porém com baixa constante dielétrica, o que lhe confere características lipofílicas, foi capaz de solubilizar melhor o ácido palmítico que possui em sua extremidade um grupo polar (COOH) ligado a uma cadeia carbônica saturada.

A massa somente apresentou um efeito positivo em extrações com DCM, sendo que nas extrações com acetato de etila, embora não seja positiva, também não é significativa para um decréscimo de concentração, mostrando assim que em solventes com menor polaridade houve saturação da matriz quando aplicada a seu nível máximo (3 gramas). Por outro lado o tempo demonstra ter efeitos significativos para o aumento de concentração nas extrações com hexano, DCM e acetato de etila indicando que à medida em que se aumentou o tempo de extração, aumentou a concentração de ácido palmítico extraído da semente.

Quando se estuda o efeito dos ciclos de extração verifica-se que apenas as amostras extraídas com hexano apresentaram efeitos negativos quando se varia de um para três ciclos. A solução de hexano:DCM, embora apresente efeito positivo, este não é significativo para o conjunto de experimentos. Através da **Tabela XXXI** pode-se dizer que à medida que se aumenta a polaridade do solvente, que será usado na extração, o solvente extrai com maior facilidade os analitos e com isso o número de ciclos se torna mais significativo.

A temperatura (X4) age de forma diferenciada para cada um dos conjuntos de experimentos. Para as extrações com hexano mostra ter um efeito positivo significativo, assim como para as extrações com DCM. Já para as amostras extraídas com a mistura dos dois solventes mostra ter um efeito negativo, porém não significativo para alterar a concentração desse ácido graxo. Os dados com acetato de etila apresentam um efeito negativo significativo.

O flush promove efeito negativo significativo em todas as extrações, com exceção das amostras extraídas com DCM, sendo este o único conjunto de amostras que aumenta sua concentração quando se aumenta a quantidade de solvente a ser empregado.

A interação entre X1X2 e X2X4 mostrou efeitos positivos significativos para as extrações com hexano. Ao analisar os dados de cada variável independente pode-se verificar que a variável X2 (tempo) exerce um fator positivo de maior intensidade que a variável X1 (massa) e que a variável X4 (temperatura) também possuiu um efeito positivo.

A interação entre X1X3 (massa x ciclos) apresenta efeitos significativos para todas as extrações, porém ao avaliar os resultados pode-se notar que à medida que a polaridade do solvente aumenta, diminui a intensidade de perda de massa do ácido palmítico nas extrações, quando se extrai as amostras com acetato de etila o efeito da interação destas duas variáveis se torna positivo. O comportamento inverso ocorre para as interações entre X1X4.

As interações entre X3X5 (ciclos X flush) e X4X5 (temperatura X flush) são significativas para as extrações com hexano e com acetato de etila, porém estas interações apresentam comportamentos inversos, sendo que, nas amostras extraídas com hexano, a primeira interação (X3X5) é significativa e age positivamente sobre o sistema. Isso significa que o acréscimo de solvente contribui para o aumento da recuperação de ácido palmítico nas extrações, se extraído com um maior número de ciclos, em solventes apolares como o hexano.

Nas amostras extraídas com acetato de etila, a interação é significativa entre X4X5, ou seja, quando se alia a variável (flush) com o aumento de temperatura, essa interação favorece a extração de ácido palmítico com solventes polares (acetato de etila).

b) Ácido Linoléico

A concentração média do ácido linoléico, segundo A0, varia em até 2 % em todas as amostras estudadas. O solvente que apresentou menor concentração deste ácido graxo foi o acetato de etila.

A massa mostra ter um efeito significativo positivo para todos os solventes, demonstrando que à medida que se aumenta a massa aumenta a concentração de ácido linoléico extraído. Porém esse efeito possui intensidade diferente para cada solvente, sendo que para solventes mais apolares esse efeito é aumentado e para solventes mais polares o mesmo efeito possui intensidade menor.

O tempo de extração (X2) somente apresentou efeitos positivos significativos para as amostras com DCM, demonstrando que quando se aumenta de 10 para 30 minutos o tempo de extração, a concentração de ácido linoléico tende a aumentar aproximadamente 0,64 %.

O flush apresenta efeitos significativos para todos os solventes, porém para as amostras extraídas com DCM esse efeito é desfavorável à extração do ácido linoléico.

Os efeitos significativos apresentados pelas amostras extraídas com a solução de hexano:DCM (1:1) mostram ser todos positivos, contribuindo assim para o aumento da recuperação do ácido linoléico. A interação entre os efeitos: X1X4 (massa/temperatura) foi significativa somente para este conjunto de amostras.

A interação entre X2X3 (tempo/ciclos) mostrou ser significativa para conjunto de amostras extraídas com hexano, porém o efeito é negativo, fazendo com que as amostras apresentem a tendência de diminuir a concentração de ácido linoléico em 0,37 %.

A relação entre a massa de amostra e a quantidade de solvente (X1X5) tem importância significativa para o acetato de etila, o que indica que esta interação, entre os dois efeitos, pode relacionar com a baixa solubilidade do ácido linoléico em solventes polares.

c) Ácido Oléico

As extrações de ácido oléico, utilizando diferentes solventes, não apresentam muitas diferenças entre si, porém quando comparados aos dados das extrações do ácido linoléico, verifica-se que os resultados médios de cada solvente são inversamente classificados quando a ordem de concentração, ou seja, a soma entre a concentração destes dois ácidos tende a ser a mesma, independente do solvente extrator. A relação oléico/linoléico (O/L) é um indicador da estabilidade do óleo, como as amostras apresentaram uma similaridade dessa relação pode-se dizer que a estabilidade auto-oxidativa é idêntica em todos os óleos extraídos (cerca de 0,3).

Amostras extraídas com hexano e com DCM possuem efeitos significativos para a variável massa (X1), porém negativos quando se eleva de 1 para 3 gramas de massa de amostra a ser extraída. Nesses casos ocorre a perda de aproximadamente 0,4 % de ácido oléico. Esse mesmo tipo de efeito também é visto quando se analisa a variável tempo para as amostras extraídas com hexano:DCM (0,16 %) e DCM (0,82 %).

A variável relacionada com a quantidade de solvente (flush), somente tem resultados significativos quando a amostra é extraída com hexano. Esse efeito deve ocorrer devido à saturação do solvente ao extrair a amostra, necessitando assim um maior volume de solvente para extrair todo o ácido graxo presente na semente de uva.

A temperatura (X4) atua de modo desfavorável para as amostras extraídas com a solução de hexano:DCM, sendo que ao elevar a temperatura de 25°C para 100°C a concentração de ácido oléico tende a diminuir 0,15 %.

A interação entre X1X3 (massa X ciclo) possui efeitos significativos, inversamente proporcionais, para as amostras extraídas com DCM e acetato de etila. À medida que aumenta o número de ciclos com o aumento da massa há uma maior solubilidade desse ácido em DCM.

A interação entre X4X5 (temperatura X flush) somente apresentou efeito significativo positivo para as extrações com hexano:DCM. A concentração de ácido oléico tende a aumentar 0,2 % quando se passa do nível mais baixo para o mais alto.

Enquanto que a interação entre X2X5 (tempo X flush) apresentou efeito significativo positivo para as amostras extraídas com DCM.

d) Ácido Esteárico

Dentre as amostras as que apresentaram menor concentração de ácido esteárico foram as extraídas com hexano. Por sua vez, as amostras extraídas com acetato de etila apresentaram concentração média superior às demais. Embora o acetato de etila seja um solvente polar ele tem baixa capacidade de polarizar, tornando-se assim um bom solvente para compostos lipofílicos.

Quando são analisados os efeitos das variáveis independentes, a variável massa (X1) possui efeitos significativos para todas as amostras extraídas, porém o único solvente que tende a aumentar a concentração de ácido esteárico quando se modifica a variável massa de 1 g para 3 g é o DCM.

Para a variável tempo (X2), as amostras extraídas com hexano e com acetato de etila apresentam efeitos positivos e significativos de mesma intensidade, indicando que com maior tempo de extração, será extraída uma maior quantidade de ácido esteárico.

As variáveis, número de ciclos (X3) e temperatura (X4), apresentam efeitos significativos para as amostras extraídas com hexano, DCM e acetato de etila. Contudo quando se avalia X3 verifica-se que nas extrações com hexano a concentração do ácido esteárico decresce quando o número de ciclos se altera de 1 para 3. Já para as amostras extraídas com acetato de etila o efeito negativo é dado quando se passa de 25°C a 100°C.

O flush atua demonstrando ter efeito significativo em todas as extrações, porém somente as amostras com DCM apresentam efeitos positivos ao modificar o flush de 30 % para 150 %. Tendo em vista que o mesmo comportamento é dado pela variável massa, pode se dizer que a quantidade de ácido esteárico sofre uma interferência quando modificamos o volume de solvente e a massa de amostra a ser analisada.

As interações entre X1X2 e X2X5 apresentaram somente efeitos significativos para as amostras extraídas com hexano. Através desses dados, pode-se dizer que, à medida que é aumentado o tempo de extração, é favorecido o aumento de concentração do ácido esteárico quando se modifica a sua massa. Na segunda interação o flush age de forma negativa quando interage com o aumento de temperatura.

O maior efeito entre duas variáveis é dado pela interação entre a temperatura e o flush quando extraídos em amostras de hexano, porém esse resultado demonstra que essas variáveis atuam desfavoravelmente para a concentração de ácido esteárico, quando relacionadas entre si. O acetato de etila também sofre um efeito significativo, porém esse efeito atua de forma positiva, visando a aumentar a concentração desse ácido, quando estas duas variáveis atuam simultaneamente.

4.2.1.2.3 ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA EXTRAÍDOS POR FLUÍDO SUPERCRÍTICO

Primeiramente serão apresentados os resultados das análises de ácidos graxos totais para amostras de Isabel/Herbemont extraídas com SFE sem a utilização de solvente modificador. Os resultados apresentados são referentes às amostras que tiveram maior rendimento com CO₂ (1, 2, 3 e 6, **Tabela XXV**, página 72) e às amostras extraídas com propano. Os resultados podem ser visualizados na **Tabela XXXII**.

Os resultados mostram semelhança com os dados apresentados em outras técnicas de extração, assim como os parâmetros estipulados na ANVISA (**Tabela XXX**). A amostra extraída na condição 6 com CO₂ (T: 45°C, P: 250 bar e densidade reduzida: 1,85), mostrou um ligeiro aumento na concentração de ácido linoléico, enquanto que as demais condições apresentaram a mesma concentração para este ácido graxo. Por outro lado, o ácido oléico apresentou uma maior concentração que as demais extrações, na menor condição de temperatura e pressão (CO₂ - 1).

Tabela XXXII: Variação da concentração dos ácidos graxos totais em óleo de semente de uva extraído por SFE em CO₂ e em propano, expressos em porcentagem.

| ácidos(#) | | CO ₂ (*) | | | | propano(*) | |
|-----------|--------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|---------|
| | | CO ₂ -1 | CO ₂ -2 | CO ₂ -3 | CO ₂ -6 | Prop-1 | Prop -2 |
| C12:0 | Láurico | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 |
| C14:0 | Mirístico | 0,03 | 0,10 | 0,10 | 0,05 | 0,08 | 0,09 |
| C16:0 | Palmítico | 0,30 | 8,94 | 9,52 | 4,21 | 8,14 | 9,07 |
| C16:1 | Palmitoleico | 3,56 | 0,35 | 0,34 | 0,13 | 0,29 | 0,32 |
| C18:2 | Linoléico | 67,6 | 62,5 | 63,1 | 73,3 | 62,4 | 59,1 |
| C18:1 | Oléico | 26,2 | 21,5 | 19,1 | 19,1 | 22,3 | 24,2 |
| C18:0 | Esteárico | 1,88 | 6,19 | 7,40 | 2,36 | 6,44 | 6,80 |
| C20:0 | Araquídico | 0,24 | 0,23 | 0,30 | 0,32 | 0,25 | 0,28 |
| C24:0 | Lignocérico | 0,09 | 0,05 | 0,06 | 0,57 | 0,04 | 0,07 |

(*) condições descritas nas **Tabelas XI** (CO₂) e **XII** (propano), **página 47**, parte experimental.

(#) ácidos identificados como seus ésteres metílicos

NA: Não analisado

ND: Não detectado

As amostras extraídas com propano obtiveram resultados semelhantes a 30 e 45°C, seguindo o mesmo perfil das concentrações obtidas com as condições 2 e 3 com CO₂. Porém os demais experimentos com CO₂ apresentaram, uma maior concentração de ácido linoléico. Esse ácido graxo (da família ω-6), devido a suas duas duplas ligações, é valorizado pela sua importância na saúde humana, sendo este, precursor de membranas celulares como a prostaglandinas, ajudando assim na prevenção de doenças do coração.

As amostras extraídas com 10 % de solventes modificadores em CO₂ foram analisadas e os resultados obtidos da quantificação de ácidos graxos no óleo de semente de uva das variedades Isabel e Herbemont estão apresentados na **Tabela XXXIII**.

Tabela XXXIII: Variação da concentração dos ácidos graxos totais em óleo de semente de uva extraído por SFE em CO₂ com adição 10% de solvente modificador a 45°C e 181 bar. Valores expressos em porcentagem

| ácidos | solvente modificador (*) | | | | | | |
|--------------------|--------------------------|------|------|------|------|--------|--------|
| | H | HD | DCM | AE | MeOH | EtOH 1 | EtOH 5 |
| C12:0 láurico | 0,03 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| C14:0 mirístico | 0,13 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,07 |
| C16:1 palmitoleico | 0,40 | 0,31 | 0,36 | 0,35 | 0,36 | 0,34 | 0,19 |
| C16:0 palmítico | 9,37 | 9,03 | 9,71 | 9,90 | 9,85 | 9,42 | 5,08 |
| C18:2 linoléico | 61,2 | 63,6 | 63,8 | 64,2 | 65,5 | 62,5 | 68,0 |
| C18:1 oléico | 21,7 | 21,1 | 17,8 | 17,7 | 16,9 | 19,6 | 23,1 |
| C18:0 esteárico | 5,06 | 5,53 | 7,74 | 7,37 | 7,04 | 7,59 | 2,91 |
| C20:0 araquídico | 0,14 | 0,20 | 0,32 | 0,28 | 0,24 | 0,29 | 0,36 |
| C24:0 lignocérico | 0,04 | 0,04 | 0,08 | 0,07 | 0,04 | 0,05 | 0,25 |

** (H) hexano, (HD) solução hexano :DCM (1:1), (DCM) diclorometano, (AE) acetato de etila e (MeOH) metanol, EtOH 1 e 2 (Etanol de acordo com as condições descritas na **Tabela XXVIII**), **página 79**. NA : Não analisado

Amostras extraídas nas mesmas condições de temperatura e pressão com solventes modificadores de diferentes polaridades e com CO₂ (condição 2) apresentaram semelhantes concentrações de ácidos graxos saturados e insaturados. A maior variação foi dada para o ácido oléico e o ácido esteárico, sendo que quando temos valores acima da média das demais amostras para um, o outro apresenta valores abaixo da média das demais amostras.

Ao compararmos os resultados obtidos com CO₂, nas mesmas condições de temperatura (45°C) e pressão (181 bar), com a amostra que foi extraída com adição de 3 % de etanol, verificou-se que não houve alteração significativa no perfil quantitativo.

Os resultados mostram que, quando a extração é realizada com maior quantidade de etanol, obtêm-se concentrações maiores de ácidos graxos insaturados como linoléico e oléico e menor concentração de ácidos graxos saturados como

palmítico e esteárico. Porém, o acréscimo de solvente, não é proporcional ao aumento de ácidos graxos insaturados e somente por este motivo não seria justificável crescer mais de 17 % de solvente modificador às extrações.

Os demais ácidos minoritários não ultrapassaram 0,5 % de concentração na amostra, confirmando a de concentração estabelecida pela ANVISA.

4.2.1.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS NOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA

As amostras extraídas por prensagem, Soxhlet, PLE e SFE apresentaram concentrações de AGT dentro dos limites estabelecidos pela ANVISA, para óleo de semente de uva comercial para fins alimentícios. As concentrações de ácido linoléico encontradas nas amostras variaram de 59 % a 70 %, sendo que a maior variação foi encontrada entre as amostras extraídas por SFE.

A relação entre a concentração de ácido oléico/ácido linoléico, que estabelece o potencial de auto-oxidação do óleo, foi determinada, sendo mantidas dentro da faixa encontrada para as amostras comerciais. Pode-se constatar que os óleos comerciais, também analisados neste trabalho (Tabela XXX), apresentaram valores de razão oléico/linoléico de 0,26 % para a amostra Ipiranga (utilizada em cosméticos e fins farmacêuticos) e 0,39 % para a amostra Borges (utilizada para fins alimentícios).

4.2.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS NÃO LIGADOS AO GLICEROL: FRAÇÃO INSAPONIFICÁVEL

4.2.2.1 ANÁLISE QUALITATIVA DA FRAÇÃO INSAPONIFICÁVEL

Para a análise dos compostos insaponificáveis (não ligados ao glicerol) foram usadas as mesmas amostras estudadas no item anterior.

A realização da análise qualitativa dos óleos comerciais, extraídos nesse trabalho, procurou verificar a presença de compostos minoritários no óleo de semente

de uva extraído por diferentes métodos de extração. Para isso fez-se a opção de analisar diretamente o óleo apenas fazendo a solubilização em DCM e derivatizando com BSTFA, como descrito na **Seção 3.5.2** (página. 50) do capítulo experimental. Com esse procedimento os compostos majoritários (triglicerídeos) ficam retidos no *liner* (a temperatura do injetor não permite a vaporização dos triglicerídeos) sem ser volatilizados e, conseqüentemente, não atingem a coluna capilar e não são analisados cromatograficamente.

A **Figura 22** apresenta os cromatogramas referentes às amostras de óleos comerciais e dos óleos produzidos por prensagem e Soxhlet da mistura de sementes de uva Isabel e Herbemont, derivatizadas com BSTFA e na **Tabela XXXIV** tem-se a identificação dos compostos encontrados nessas amostras.

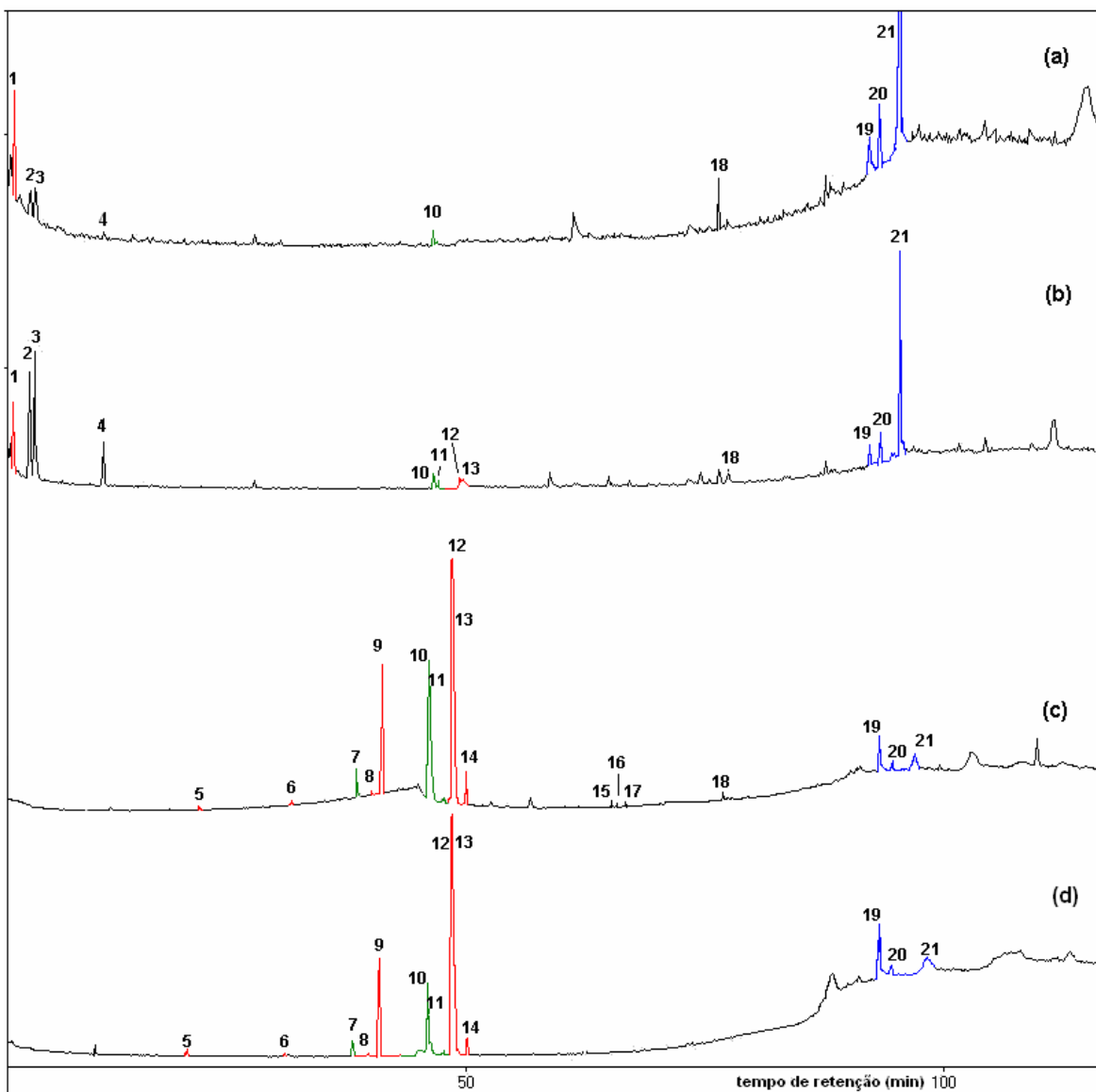


Figura 22: Cromatogramas do Íon Total das amostras de óleo de semente de uva derivatizadas com BSTFA: (a) óleo Borges, (b) óleo Ipiranga, (c) óleo de prensagem de semente de uva Isabel/Herbemont e (d) óleo de extração em Soxhlet de semente de uva Isabel/Herbemont

Condições cromatográficas descritas na parte experimental (*página 53*) e identificação dos picos de acordo com a **Tabela XXXV**

Tabela XXXIV: Identificação dos picos presentes na **Figura 22**.

| pico | fórmula | compostos |
|------|--|--------------------------------|
| 1 | C ₈ H ₁₈ O ₄ Si ₂ | ácido oxálico bis (*) |
| 2 | C ₁₀ H ₁₆ O | decadienal |
| 3 | C ₁₀ H ₁₆ O | decadienal (isômero) |
| 4 | C ₁₅ H ₂₄ O | 4 metil-2,6-di-tert-butilfenol |
| 5 | C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si | ácido laúrico (*) |
| 6 | C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si | ácido mirístico (*) |
| 7 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | palmitato de etila |
| 8 | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ Si | ácido palmitoleico (*) |
| 9 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | ácido palmítico (*) |
| 10 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | linoleato de etila |
| 11 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | oleato de etila |
| 12 | C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si | ácido linoléico (*) |
| 13 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si | ácido oléico (*) |
| 14 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si | ácido esteárico (*) |
| 15 | C ₂₇ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | monolinoleína |
| 16 | C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂ | monooleína |
| 17 | C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si ₂ | monoestearina |
| 18 | C ₃₀ H ₅₀ | escaleno |
| 19 | C ₂₈ H ₄₈ O | ergostenol |
| 20 | C ₂₉ H ₅₀ O | estigmastenol |
| 21 | C ₃₂ H ₅₆ O ₂ Si | estigmasterol (*) |

(*) *identificado como derivado trimetil silil*

Os picos presentes nos cromatogramas da **Figura 22** estão identificados com cores para a diferenciação do grupo funcional a que os compostos pertencem. Em vermelho encontram-se os ácidos derivatizados com BSTFA, em verde os ésteres etílicos e em azul os fitosteróis.

Os óleos comerciais que já passaram pelo processo de industrialização (refino, degomagem e neutralização), apresentam poucos compostos identificados, mas é importante ressaltar, que apesar do processo industrial, ainda são encontrados alguns

fitosteróis e também alguns ésteres etílicos na amostra, que não são destruídos. Além disso, não há diferenças significativas entre o óleo usado para fins alimentícios (A) e o óleo utilizado para fins farmacêuticos e cosméticos (B).

Apesar desta análise ser inicialmente qualitativa, é possível verificar que a principal diferença entre os óleos comerciais e óleos extraídos por prensagem e Soxhlet, está na maior quantidade de ésteres e ácidos graxos livres presentes nestes últimos métodos de extração. As amostras extraídas por Soxhlet e prensagem apresentaram semelhantes compostos identificados.

Contrariamente aos AGT, onde não se esperavam grandes diferenças no teor de compostos (majoritários) obtidos em diferentes processos de extração, a fração insaponificável deve sofrer influência direta do processo de extração. Desta forma, fez-se, também, a análise qualitativa dos compostos nestas frações obtidas por PLE e por SFE.

4.2.2.1.1 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE)

As condições de extração estão descritas na parte experimental, **Seção 3.4.2.2, página 42**. A **Figura 23** apresenta o cromatograma do experimento com 3 g de amostra, 10 minutos de extração, 1 ciclo, 50°C e flush de 150 %, realizado com a mistura das variedades Isabel/Herbemont, utilizando-se como solvente extrator o hexano. Os outros cromatogramas se apresentaram bastante similares a este, por esta razão deixam de ser apresentados aqui. Todos os resultados serão analisados na forma de tabelas.

O cromatograma da **Figura 23** apresenta compostos como ácidos graxos livres (vermelho), responsáveis pela acidez do óleo, ésteres metílicos (rosa), ésteres etílicos (verde) e fitosteróis (azul).

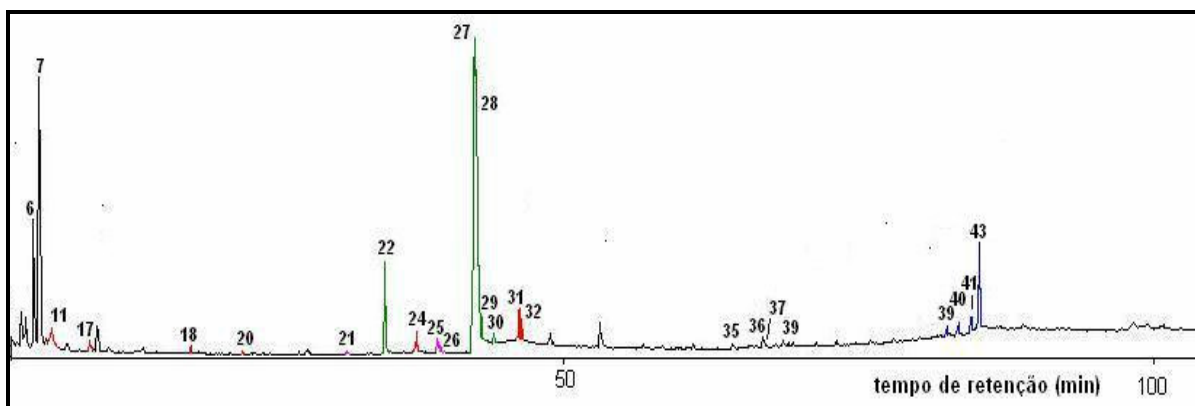


Figura 23: Cromatograma do Íon Total para o óleo extraído por PLE da mistura das variedades de uvas Isabel/Herbemont, com hexano como solvente
Condições cromatográficas: citadas no texto (Seção 3.6.3.2, pág. 53) e identificação dos picos de acordo com a Tabela XXXVI.

Através da **Figura 23**, podemos verificar que a quantidade de ácidos graxos livres nesta extração é inferior ao de ésteres etílicos, o que não se percebia nas extrações obtidas com Soxhlet e prensagem. Isso indica que a maior quantidade dos ácidos graxos livres poderá ser proveniente do aquecimento da amostra por um longo período ou pelo contato com a luz e ar durante o processo de extração.

A identificação dos compostos, de acordo com a numeração da **Figura 23**, está apresentada na **Tabela XXXV**. Essa Tabela apresenta também a identificação dos compostos nos demais cromatogramas relativos ao planejamento experimental descrito na parte experimental (**Tabela X**, página 45).

Tabela XXXV: Análise qualitativa do planejamento experimental com hexano na extração com líquido pressurizado, da fração insaponificável da mistura de sementes de uva Isabel e Herbemont.

| n° | fórmula | nome | extrações com hexano | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--|-------------------------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 1 | C ₇ H ₁₂ O | heptenal | | | | | | | | | | | | | | | X | X |
| 2 | C ₁₁ H ₂₂ O ₄ Si | ác. butil succínico (*) | | | | | | | | | | X | | | | | X | |
| 3 | C ₉ H ₁₆ O | ciclo nonanona | X | | | | | | | | | | | | | | | X |
| 4 | C ₉ H ₂₀ O ₂ Si | ác. capríco (*) | | X | | | | | | | | | | X | | | | |
| 5 | C ₉ H ₁₆ O | nonenal | | X | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | C ₁₀ H ₁₆ O | decadienal | X | | X | X | | X | X | X | X | X | X | | X | X | X | |
| 7 | C ₁₀ H ₁₆ O | decadienal (isômero) | X | | X | X | | X | X | X | X | X | X | | X | X | X | |
| 8 | C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | caprilato de etila | | | | | | | | X | | | | | | | | |
| 9 | C ₁₀ H ₂₄ O ₃ Si ₂ | ác. butanoico (*) | | | | X | | | | | | | | | | | | |
| 10 | C ₁₁ H ₁₈ OSi | feniletanol (*) | | | | | | | | | | X | | | X | | | |
| 11 | C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si | ác. caprílico (*) | X | X | X | X | | X | X | | | X | | X | X | | | X |
| 12 | C ₁₂ H ₂₀ O | dodecadienal | | | | | | | X | | | X | X | | | | | |
| 13 | C ₁₂ H ₂₆ O ₂ Si | ác. pelargônico (*) | | X | X | X | | X | | | | | X | | | | X | |
| 14 | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | caprato de etila | | | X | | X | | | X | | | X | | X | X | | |
| 15 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | laurato de etila | | | X | X | | | | X | | | | | | | | |
| 16 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | miristato de etila | | | X | | | | | X | | | | | | | | |
| 17 | C ₁₃ H ₂₈ O ₂ Si | ác. cáprico (*) | X | X | X | X | X | X | X | | | X | | X | X | X | X | X |
| 18 | C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si | ác. laurico (*) | X | X | X | X | X | X | X | | | X | | X | X | X | X | X |
| 19 | C ₁₅ H ₃₂ O ₄ Si | ác. azelaico (*) | | | X | X | | | | | | | | X | | | | |
| 20 | C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si | ác. mirístico (*) | X | X | X | X | X | X | X | | | X | | X | | | X | X |
| 21 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | palmitato de metila | X | | X | | | | | X | | | | | | | | |
| 22 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | palmitato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 23 | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ Si | ác. palmitoleico (*) | | X | X | X | X | | | | | | | X | | | X | X |
| 24 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | ác. palmítico (*) | X | X | X | X | X | X | X | | | X | | X | X | X | X | X |
| 25 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | linolenato de metila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 26 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | oleato de metila | X | X | X | X | X | | | X | X | X | X | | | | X | X |
| 27 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | linoleato etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 28 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | oleato etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 29 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | linolenato etila | X | | X | X | X | X | | X | X | X | X | | X | X | X | X |
| 30 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | estearato etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 31 | C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si | ác. linoléico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 32 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si | ác. oléico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 33 | C ₂₁ H ₃₈ O ₂ Si | ác. linolênico (*) | | X | X | X | X | | | | | | | X | X | X | X | X |
| 34 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si | ác. esteárico (*) | | X | X | X | X | X | X | | | | | X | X | X | X | X |
| 35 | C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | monopalmitina (*) | X | | X | | | X | | | | X | | | | | | |
| 36 | C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂ | monolinoleína (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 37 | C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si ₂ | monooleína (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 39 | C ₃₀ H ₅₀ | escaleno | X | | X | X | X | | | X | X | X | X | X | X | X | X | |
| 40 | C ₂₈ H ₄₈ O | brassicasterol | X | X | | | | | | | | X | X | X | | | | |
| 42 | C ₂₉ H ₅₀ O | clionasterol | X | X | | X | X | X | X | X | | | X | | X | X | X | X |
| 41 | C ₃₁ H ₅₆ OSi | campesterol (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | X | X | | X | X |
| 43 | C ₃₂ H ₅₆ OSi | estigmasterol (*) | | | X | X | X | | X | X | | | | X | X | | X | X |
| 44 | C ₃₂ H ₅₈ OSi | sitosterol (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | | | X | X | X | X | X | X |

(*) detectado como derivado siliado (TMS).

O estudo dos compostos minoritários presentes nos óleos procura avaliar alterações na composição destes óleos por influência de alguma das variáveis aplicadas (temperatura, pressão e tempo de extração).

Ao analisar a **Tabela XXXV** verifica-se que existem poucos compostos das classes funcionais que conferem propriedades indesejáveis nos óleos extraídos com hexano por PLE, tais como aldeídos e cetonas. Nas extrações realizadas a 100°C constatou-se que além do decadienal que está presente em quase todos os extratos, há presença de alguns compostos oxigenados de baixo peso molecular como heptenal e ciclo octanona nos experimentos que tiveram o maior tempo de extração (experimento H15 e H16). Quando é feita uma análise geral da **Tabela XXXV**, não observamos grandes diferenças entre compostos presentes nas amostras, sendo que todas apresentam ácidos graxos livres, ésteres etílicos e alguns ésteres metílicos.

Os ácidos graxos livres presentes nessas amostras são responsáveis pelo grau de acidez em óleos vegetais. Quando um óleo bruto, que vai ser comercializado, possui altos índices de ácidos graxos livres o processo de refinação industrial deve ser mais rigoroso e com isso pode prejudicar a qualidade do produto final.

Entre os compostos presentes na **Tabela XXXV** estão o brassicasterol, o clionasterol e o estigmasterol, que se apresentam na forma não esterificada. Os fitosteróis além de exibir propriedades antiinflamatórias e antitumorais, reduzem a absorção do colesterol auxiliando na prevenção de doenças do coração [91,92]. Os demais fitosteróis foram encontrados na forma derivatizada (compostos 41, 43, 45), de acordo com a reação mostrada na **Figura 24**. A presença de compostos não sililados demonstra que o processo de derivatização não é eficiente o bastante para estes álcoois, porém estas moléculas não necessitam ser derivatizadas para a análise em cromatografia gasosa.

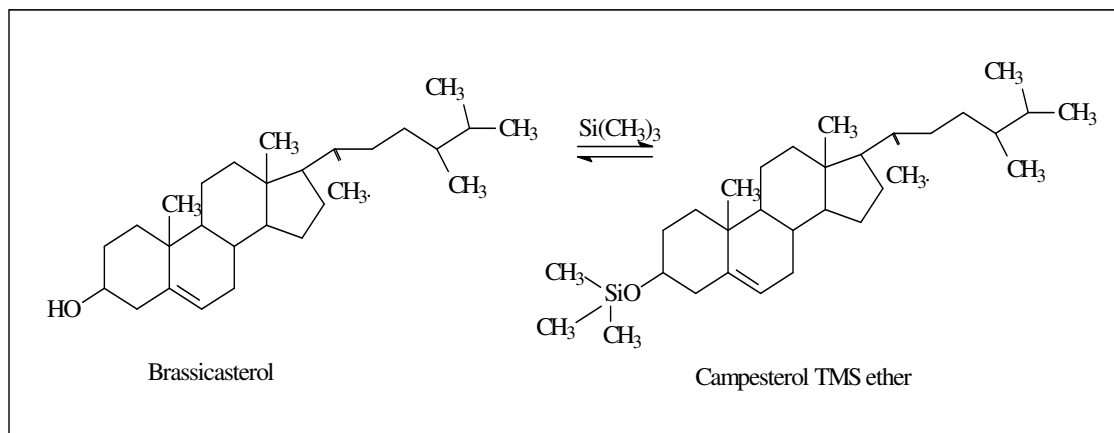


Figura 24: Esquema da reação de derivatização de fitosteróis com trimetil silano.

Apesar dos fitosteróis atuarem como agentes benéficos à saúde humana, estudos indicam que sob determinadas condições de alta temperatura, presença de luz e oxigênio (principalmente em processos de refinamento) esses compostos podem se transformar em compostos como: o estigmasta-3,5-dieno, causador de efeitos patológicos a saúde [90,92].

Tendo em vista os cromatogramas dos extratos de PLE utilizando a solução de hexano/DCM (1:1), DCM e acetato de etila não apresentaram mudanças significativas em relação ao hexano, serão apresentadas, em anexo (**Anexo I**, página 201) somente as tabelas com os compostos identificados nesses extratos.

As **Tabelas** referentes às extrações realizadas em PLE mostram que, além dos compostos já citados, há também a presença de glicerol livre em extrações realizadas com hexano/DCM, DCM e acetato de etila.

4.2.2.1.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (SFE)

Quando se faz extrações com fluido supercrítico, procura-se maior seletividade na extração de compostos. Na **Tabela XXXVI** estão presentes os compostos obtidos com as extrações, utilizando dióxido de carbono e propano como solvente na extração supercrítica.

Tabela XXXVI: Compostos identificados na caracterização do óleo de semente de uva extraído por SFE com CO₂ e propano como solventes.

| N° | fórmula | nome | extração com fluido supercrítico (SFE) | | | | | | | | | |
|----|--|----------------------|--|---|---|---|---|---|---------|---|---|---|
| | | | CO ₂ | | | | | | propano | | | |
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | | |
| 1 | C ₉ H ₂₀ O ₂ Si | ác. capríco (*) | X | | | | | | | | | |
| 2 | C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | caprilato de etila | X | | | | | | | | | |
| 3 | C ₁₁ H ₁₈ O ₂ Si | feniletanol (*) | X | | X | X | | | X | X | | |
| 4 | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | caprato de etila | X | | | | | | | | | |
| 5 | C ₉ H ₁₈ O ₄ Si ₂ | succinato de etila | X | | | X | X | X | | | | |
| 6 | C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂ | ác. succínico | | | | X | | | | | | |
| 7 | C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si | ác. caprílico (*) | X | X | | X | X | X | X | X | | |
| 8 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃ | glicerol (*) | X | | X | X | X | X | X | X | | |
| 9 | C ₁₀ H ₁₆ O | decadienal | X | X | X | X | X | | | | | |
| 10 | C ₁₂ H ₂₆ O ₂ Si | ác. pelargônico (*) | X | X | X | X | | | | X | X | |
| 11 | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | caprato de etila | X | X | | | | | X | X | | |
| 12 | C ₁₃ H ₂₈ O ₂ Si | ác. cáprico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | |
| 13 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | laurato de etila | X | | X | | X | X | | | | |
| 14 | C ₁₀ H ₂₀ O ₄ Si ₂ | ácido fumárico (*) | | | | | X | X | | | | |
| 15 | C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si | ác. láurico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 16 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | miristato de etila | X | | | | X | | | | | |
| 17 | C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si | ác. mirístico (*) | X | | X | X | X | X | X | X | | |
| 18 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | palmitato de metila | X | X | X | X | X | | | X | | |
| 19 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | palmitato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 20 | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ Si | ác. palmitoleico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | | |
| 21 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | ác. palmítico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 22 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | linolenato de metila | | | | X | X | | | X | | |
| 23 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | oleato de metila | | | | X | X | | | X | | |
| 24 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | linoleato etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 25 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | oleato etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 26 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | linolenato etila | X | X | | X | X | X | X | X | | |
| 27 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | estearato etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 28 | C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si | ác. linoléico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 29 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si | ác. oléico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 30 | C ₂₁ H ₃₈ O ₂ Si | ác. linolênico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 31 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si | ác. esteárico (*) | X | X | X | X | X | | | X | | X |
| 32 | C ₂₃ H ₄₃ O ₂ Si | ác. araquídico (*) | X | | X | X | X | | | X | | |
| 33 | C ₂₅ H ₅₂ O ₂ Si | ác. lignocérico (*) | X | | X | X | X | X | | | | |
| 34 | C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | monopalmitina (*) | X | | X | X | X | X | X | X | | |
| 35 | C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂ | monolinoleína (*) | X | | X | X | X | X | X | X | | |
| 36 | C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si ₂ | monooleína (*) | X | | X | X | X | X | X | X | | |
| 37 | C ₃₀ H ₅₀ | escaleno | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

Continuação da **Tabela XXXVI**:

| N° | fórmula | nome | Extração com fluido supercrítico (SFE) | | | | | | | | |
|----|-------------------------------------|-------------------|--|---|---|---|---|---|---------|---|---|
| | | | CO ₂ | | | | | | propano | | |
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | |
| 38 | C ₂₈ H ₄₈ O | brassicasterol | | X | X | | | | X | X | X |
| 39 | C ₂₉ H ₄₈ O | estigmastadienol | | X | | | | | | X | X |
| 40 | C ₂₉ H ₅₀ O | clionasterol | | X | | | | | | X | X |
| 41 | C ₃₁ H ₅₆ OSi | campesterol (*) | X | | | X | X | X | | | |
| 42 | C ₃₂ H ₅₆ OSi | estigmasterol (*) | X | | X | X | X | X | | | |
| 43 | C ₃₂ H ₅₈ OSi | sitosterol (*) | X | | X | X | X | X | | | |

(*) detectado como derivado sililado (TMS).

O óleo extraído com 30°C e 110 bar (condição 1) com CO₂ apresentou compostos de menor peso molecular (picos 1, 2 e 4), que os outros óleos extraídos com CO₂ e propano não apresentaram. Já compostos como o linoleato de metila e o oleato de metila estão presentes nos experimentos (4, 5) realizados com as menores densidades reduzidas.

Compostos como aldeídos (pico 9), ácidos (pico 6) e ésteres (pico 5) estão presentes principalmente das extrações que utilizam CO₂ como solvente extrator. As extrações com propano apresentaram poucos compostos minoritários em relação às extrações com CO₂, mostrando assim cromatogramas mais limpos.

A **Tabela XXXVII** apresenta os compostos obtidos com as extrações utilizando dióxido de carbono com 10 % de diferentes solventes modificadores. O etanol foi utilizado também com a adição de 3, 5,15 e 20 %.

Tabela XXXVII: Compostos identificados na fração de insaponificáveis, do óleo de semente de uva, extraídos por SFE com diferentes solventes modificadores

| n° | fórmula | nome | solventes modificador | | | | | etanol | | | | |
|----|--|----------------------------|-----------------------|----|-----|----|------|--------|----|-----|-----|-----|
| | | | H | HD | DCM | Ac | MeOH | 3% | 5% | 10% | 15% | 20% |
| 1 | C ₈ H ₁₈ O ₂ Si | Ác. dimetil propanóico (*) | X | X | X | | X | | | X | X | X |
| 2 | C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | caprilato de etila | X | | | | | | | | | |
| 3 | C ₁₁ H ₁₈ OSi | feniletanol (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 4 | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | caprato de etila | X | X | X | X | X | | | | | |
| 5 | C ₉ H ₁₈ O ₄ Si ₂ | succinato de etila | | | | | | | | X | X | X |
| 6 | C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂ | ác. succínico | | | | | | X | X | X | X | X |
| 7 | C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si | ác. caprílico (*) | X | X | X | | | X | X | X | X | X |
| 8 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃ | glicerol (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 9 | C ₁₀ H ₁₆ O | decadienal | X | | | | | | | | | |
| 10 | C ₁₂ H ₂₆ O ₂ Si | ác. pelargônico (*) | X | X | | | | | | X | X | X |
| 11 | C ₁₃ H ₂₈ O ₂ Si | ác. cáprico (*) | X | X | X | | X | X | X | X | X | X |
| 12 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | laurato de etila | | | X | | | | | | | |
| 13 | C ₁₀ H ₂₀ O ₄ Si ₂ | ácido fumárico (*) | | | | | | | | | X | |
| 14 | C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si | ác. laurico (*) | X | X | X | | X | | X | X | X | X |
| 15 | C ₁₅ H ₃₂ O ₄ Si | ác. azelaico (*) | | | | | | | | | X | |
| 16 | C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si | ác. mirístico (*) | X | X | X | | X | X | X | X | X | X |
| 17 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | palmitato de metila | X | X | X | X | X | | X | X | X | |
| 18 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | palmitato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 19 | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ Si | ác. palmitoleico (*) | X | X | X | | X | X | X | X | X | X |
| 20 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | ác. palmítico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 21 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | linolenato de metila | X | X | X | X | X | | | | | |
| 22 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | oleato de metila | | | X | X | X | | | | | |
| 23 | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ | estearato de metila | | | | X | X | | | | | |
| 24 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | linoleato etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 25 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | oleato etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |

Continuação da **Tabela XXXVII:**

| n° | fórmula | nome | solventes modificador | | | | | etanol | | | | | |
|----|--|---------------------|-----------------------|----|-----|----|------|--------|----|-----|-----|-----|---|
| | | | H | HD | DCM | Ac | MeOH | 3% | 5% | 10% | 15% | 20% | |
| 26 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | linolenato etila | X | X | X | X | X | | | | | X | |
| 27 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | estearato etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 28 | C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si | ác. linoléico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 29 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si | ác. oléico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 30 | C ₂₁ H ₃₈ O ₂ Si | ác. linolénico (*) | X | X | X | X | X | | | X | X | X | X |
| 31 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si | ác. esteárico (*) | X | X | X | X | X | | | X | X | X | X |
| 32 | C ₂₃ H ₄₃ OSi | ác. araquídico (*) | X | X | X | | | | | | | | |
| 33 | C ₂₅ H ₅₂ OSi | ác. lignocérico (*) | X | X | | | | | | | | | |
| 34 | C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | monopalmitina (*) | X | X | X | | | | | X | X | X | X |
| 35 | C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂ | monolinoleina (*) | X | X | X | X | X | | | X | X | X | X |
| 36 | C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si ₂ | monooleina (*) | X | X | X | X | X | | | X | X | X | X |
| 37 | C ₂₇ H ₆₀ O ₄ Si ₂ | monoestearina(*) | X | X | | | X | | | | | | |
| 38 | C ₃₀ H ₅₀ | escaleno | X | X | X | X | X | | | X | X | | X |
| 39 | C ₂₈ H ₄₈ O | brassicasterol | X | X | X | | | | X | X | X | X | X |
| 40 | C ₂₉ H ₄₈ O | estigmastadienol | | | | X | X | | X | X | X | | |
| 41 | C ₂₉ H ₅₀ O | clionasterol | | | | X | X | | X | X | X | | |
| 42 | C ₃₁ H ₅₆ OSi | campesterol (*) | | | | | X | | | | | | |
| 43 | C ₃₂ H ₅₆ OSi | estigmasterol (*) | X | X | X | X | X | | | | | | X |
| 44 | C ₃₂ H ₅₈ OSi | sitosterol (*) | X | X | X | X | X | | | | | | X |

(*) *detectado como derivado siliado (TMS).*

A adição de solventes modificadores de diferentes polaridades foi realizada com o intuito de verificar a presença de compostos de classes distintas, porém os extratos obtidos apresentaram perfis semelhantes. A exceção foi das amostras de hexano e hexano/DCM (1:1) que continham muitos picos minoritários sugerindo a presença de hidrocarbonetos. Estes compostos não puderam ser identificados através da biblioteca por apresentarem fragmentação muito semelhante para todos os picos.

O glicerol encontra-se em todas as extrações obtidas por SFE com solventes modificadores, porém compostos como ácido succínico e succinato de etila foram encontrados somente nos óleos extraídos com etanol.

4.2.2.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA FRAÇÃO INSAPONIFICÁVEL

4.2.2.2.1 ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA COMERCIAIS E OBTIDOS POR TÉCNICAS CLÁSSICAS (PRENSAGEM E SOXHLET)

Na fração de compostos que não está ligada ao glicerol foram quantificados ácidos graxos livres, ésteres metílicos e ésteres etílicos em amostras de semente de uva da mistura Isabel/Herbemont, extraídas por prensagem, Soxhlet, PLE e SFE. A quantificação é dada pelo método de padronização interna, levando em consideração o fator de resposta calculado através da relação de concentração e área dos padrões. O procedimento proposto neste estudo está descrito no capítulo de experimental, **página 50**, assim como os padrões utilizados para a quantificação.

Cada classe de compostos possui íons característicos que conferem a cada analito um grau de sensibilidade frente ao detector de espectrometria de massas. A **Figura 25** apresenta os cromatogramas, no modo SIM, para a amostra extraída por prensagem e para a mistura de padrões, usados para identificar os compostos.

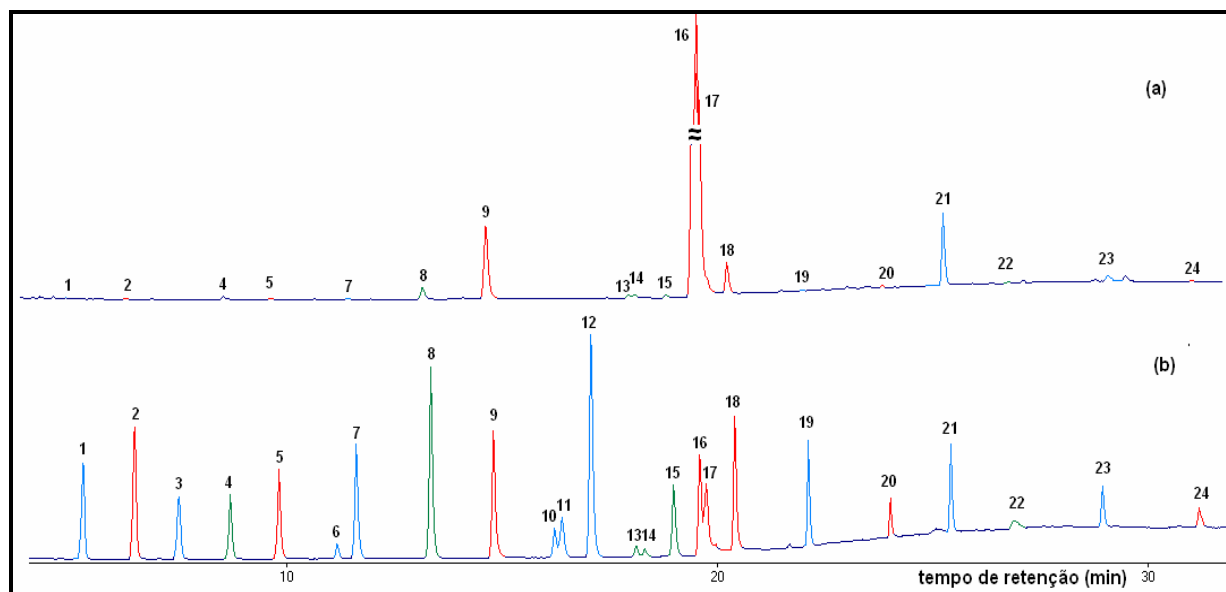


Figura 25: Cromatograma no modo SIM (GC/MS) da mistura de padrões (a) e do óleo da prensagem das sementes de uva da variedade Isabel/Herbemont (b) para análise qualitativa de compostos insaponificáveis.

Condições de análise estão descritas na Seção 3.5.2, página 51.

A identificação dos picos apresentados nessa **Figura** pode ser vista na **Tabela XXXVIII**. A solução padrão foi construída com todos os compostos na mesma concentração (20 mg L^{-1}) entretanto, escolheram-se íons, para a análise desta solução, que apresentassem os menores fragmentos de massas (não eram pico base) para os componentes sabidamente majoritários na amostra (picos relacionados aos ácidos linoléico e oléico e seus derivados 10, 11, 13,14 16, 17). Mesmo com essa condição, os picos 16 e 17 foram os majoritários na **Figura 25**. Embora, a maioria das vezes, se deseje uma maior sensibilidade para os compostos analisados, esse fato não é desejável, para amostras como o óleo de semente de uva, que possui mais de 70 % de um único analito. Com menor sensibilidade desses compostos é possível analisar uma amostra mais concentrada e obter dados quantitativos de analitos que estão presentes em baixas concentrações sem que ocorra saturação com o composto majoritário.

Tabela XXXVIII: Compostos presentes na fração não ligada ao glicerol do óleo de semente de uva.

| n° | Fórmula | compostos | íons |
|----|------------------------------------|---|------|
| 1 | éster metílico do ác. láurico | C ₁₃ H ₂₆ O ₂ | 74 |
| 2 | ác. láurico (derivado TMS) | C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si | 73 |
| 3 | éster metílico do ác. mirístico | C ₁₅ H ₃₀ O ₂ | 74 |
| 4 | éster etílico do ác. mirístico | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 88 |
| 5 | ác. mirístico (derivado TMS) | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | 73 |
| 6 | éster metílico do ác. palmitoleico | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 74 |
| 7 | éster metílico do ác. palmítico | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 74 |
| 8 | éster etílico do ác. palmítico | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 88 |
| 9 | ác. palmítico (derivado TMS) | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | 73 |
| 10 | éster metílico do ác. linoléico | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | 74 |
| 11 | éster metílico do ác. oléico | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | 74 |
| 12 | éster metílico do ác. esteárico | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ | 74 |
| 13 | éster etílico do ác. linoléico | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | 88 |
| 14 | éster etílico do ác. linolênico | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | 88 |
| 15 | éster etílico do ác. esteárico | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | 88 |
| 16 | ác. linoléico (derivado TMS) | C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si | 73 |
| 17 | ác. oléico (derivado TMS) | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si | 73 |
| 18 | ác. esteárico (derivado TMS) | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si | 73 |
| 19 | éster metílico do ác. araquídico | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ | 74 |
| 20 | éster etílico do ác. araquídico | C ₂₂ H ₄₄ O ₂ | 88 |
| 21 | ác. araquídico (derivado TMS) | C ₂₃ H ₅₀ O ₂ Si | 73 |
| 22 | PI | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | 74 |
| 23 | éster metílico do ác. lignocérico | C ₂₅ H ₅₀ O ₂ | 74 |
| 24 | ác. lignocérico (derivado TMS) | C ₂₇ H ₅₆ O ₂ Si | 73 |

**TMS: compostos siliados pela derivatização com BSTFA.

Os resultados obtidos para a análise das amostras extraídas por prensagem e Soxhlet e das amostras adquirida comercialmente podem ser visualizados na **Figura 26**. Nesta figura os compostos foram agrupados ácidos graxos livres,ésteres metílicos e ésteres etílicos.

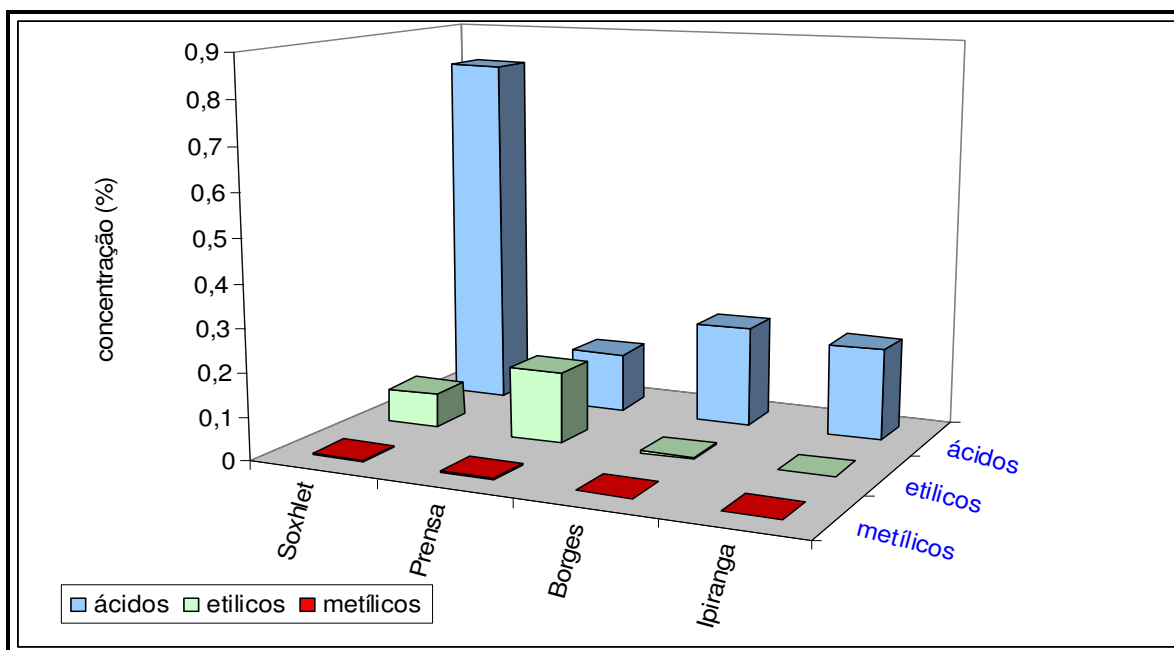


Figura 26: Concentração de ácidos graxos livres, ésteres metílicos e ésteres etílicos em amostras de prensagem e Soxhlet do óleo de semente de uva Isabel/Herbemont e das amostras comerciais.

As amostras analisadas apresentaram concentração de ésteres metílicos abaixo de 0,01%. A concentração de ésteres etílicos permaneceu entre 0,002 % e 0,16 %, sendo que, a amostra extraída por prensagem apresentou maior teor destes compostos.

As amostras comerciais apresentaram concentrações semelhantes e próximas a 0,2%, enquanto que as amostras extraídas por Soxhlet apresentaram maior concentração de ácidos graxos livres que amostras extraídas por prensagem, o que pode indicar que o uso da temperatura favorece a formação desses compostos.

A análise de acidez em um óleo vegetal é importante em sua comercialização, sugere-se que não ultrapasse a 0,5 %, caso esse fato ocorra, é necessário que esse

óleo passe por uma etapa mais rigorosa de refinamento, conseqüentemente quanto maior a concentração de ácidos graxos livres maior será o custo de produção.

4.2.2.2.2 ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA EXTRAÍDOS POR EXTRAÇÃO COM LIQUIDO PRESSURIZADO

Foram analisadas as amostras extraídas através do planejamento experimental 2^{5-1} que utilizaram como solventes hexano, solução de hexano:DCM (1:1), DCM e acetato de etila. Os resultados serão apresentados levando em consideração os efeitos sobre cada variável empregada sobre a concentração de ésteres etílicos e ácidos graxos livres. Os valores, expressos em concentração, estão apresentados em forma de Tabela no **Anexo II**. Para a análise dos efeitos foi utilizada a **Equação** definida na **Seção 4.1.2.2**, página 62. O efeito final medido neste caso é a soma das concentrações dos ésteres etílicos.

A análise da concentração de ésteres etílicos presentes em amostras do óleo de semente de uva extraído por PLE foi realizada através da construção de um modelo estatístico, onde leva-se em consideração os efeitos que as variáveis empregadas no método causam na concentração dos analitos. A **Tabela XXXIX** apresenta os coeficientes dos modelos experimentais para a análise de ésteres etílicos, encontrados para cada solvente utilizado na extração do óleo a partir das sementes de uva da mistura de variedades Isabel e Herbemont.

Tabela XXXIX: Coeficientes do modelo estatístico construído para ésteres etílicos em amostras de óleos extraídas por PLE, usando diferentes solventes extratores.

| coeficientes | H | HD | DCM | AE |
|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| A0 | 0,09 | 0,33 | 0,12 | 0,30 |
| A1 | -0,04 | -0,02 | 0,07 | -0,26 |
| A2 | -0,01 | -0,10 | 0,09 | 0,14 |
| A3 | >0,01 | -0,14 | 0,08 | 0,12 |
| A4 | -0,06 | 0,44 | >0,01 | 0,12 |
| A5 | 0,03 | 0,16 | 0,02 | -0,09 |
| A1A2 | 0,02 | -0,14 | 0,10 | -0,08 |
| A1A3 | >0,01 | -0,14 | 0,08 | -0,11 |
| A1A4 | 0,06 | >0,01 | 0,02 | -0,07 |
| A1A5 | -0,05 | -0,24 | 0,01 | 0,09 |
| A2A3 | 0,06 | -0,23 | 0,11 | 0,25 |
| A2A4 | >0,01 | -0,027 | -0,002 | 0,26 |
| A2A5 | -0,02 | -0,09 | 0,04 | -0,22 |
| A3A4 | 0,01 | -0,06 | 0,02 | 0,29 |
| A3A5 | -0,02 | -0,19 | 0,04 | -0,24 |
| A4A5 | -0,04 | 0,18 | 0,07 | -0,24 |

Coeficientes A0: média da concentração; A1: massa; A2: tempo de extração; A3: número de ciclos; A4: temperatura; A5: flush. Solventes utilizados: H: hexano, HD: sol. hexano: DCM (1:1), DCM: diclorometano, AE: acetato de etila.

A média da concentração de ésteres etílicos em amostras extraídas por PLE é apresentada pelo coeficiente A0. Segundo os dados apresentados na **Tabela XXXIX** pode-se dizer as amostras extraídas com hexano/DCM apresentaram maior concentração de ésteres (0,33 %). Os demais solventes tiveram a média de sua concentração entre 0,09 % e 0,3 %.

A variável massa apresenta efeito significativo quando as amostras são extraídas com hexano, DCM e acetato de etila, porém esse efeito é apresentado de forma negativa influenciando no decréscimo de concentração de ésteres, a medida que, é aumentado a massa de 1 para 3 gramas. O maior coeficiente é dado pelo modelo de

acetato de etila (0,261) que é explicado por ser o solvente mais polar e pode apresentar resistência na extração destes compostos que são apolares.

O tempo é dado como uma variável que apresenta efeitos significativos para os solventes hexano/DCM e DCM. Sendo que somente o último apresenta um efeito significativo positivo, ou seja, a medida que se aumenta de 10 para 30 minutos o tempo de extração se tem um aumento na concentração de ésteres etílicos.

A variável que corresponde ao número de ciclos apresenta efeito significativos para as amostras extraídas com Hexano/DCM e DCM, porém essa variável confirma os efeitos do tempo onde somente o DCM foi responsável pelo aumento de concentração (0,08 %). Ao aumentar o número de ciclos e o tempo faz com que se aumente o poder de interação do solvente com o analito e com isso a uma maior solubilidade no slvente causando uma maior extração.

A temperatura influência de forma negativa na concentração de ésteres etílicos em hexano, porém esse fato se posiciona de forma contrária para amostras extraídas com hexano/DCM que tende aumentar 0,43 % de ésteres quando se extraí a 100°C.

O flush possui efeito positivo para as amostras de hexano e hexano/DCM, sendo que as extrações com hexano DCM tendem a aumentar 0,16 % quando se passa para 150 % de flush.

Os efeitos mais significativos para ésteres etílicos são visto quando ocorre a interação entre duas variáveis. Quando há interação entre o tempo e o número de ciclos ou o tempo e o flush, verifica-se que todos os solventes apresentam efeitos significativos. Sendo que a primeira interação apresenta efeitos positivos para quase todos os solventes com exceção das amostras extraídas com hexano, que possui a tendência de diminuir a concentração em 0,23 %. Por outro lado, as amostras de DCM, tendem a aumentar a sua concentração em 0,04 % quando ocorre a interação entre o tempo e flush, esse efeito é demonstrado de maneira negativa para os demais solventes.

O flush também atua de forma significativa quando interage com o número de ciclos e a temperatura, fazendo com que todas as amostras possuam efeitos significativos. As amostras extraídas com DCM apresentam efeitos positivos com

aumento de 0,04 % e 0,07 % da concentração com a interação entre ciclos/flush e temperatura /flush, respectivamente. As variáveis, temperatura e flush se mostram de forma significativa também para as amostras extraídas com hexano/DCM, enquanto nas demais extrações os efeitos são negativos para a extração.

Para analisar os efeitos das extrações com PLE na concentração de ácidos graxos foi construído um modelo experimental onde seus coeficientes estão apresentados na **Tabela XL**, valendo as mesmas considerações feitas para os dados de **Tabela XXXIX**.

Tabela XL: Coeficientes dos modelos construídos para ácidos graxos livres em amostras de óleos extraídas por PLE.

| coeficiente | H | HD | DCM | AE |
|-------------|---------------|----------------|----------------|---------------|
| A0 | 1,23 | 0,933 | 0,257 | 0,848 |
| A1 | 0,556 | 0,0311 | 0,0530 | -0,192 |
| A2 | -0,257 | -0,511 | >0,01 | 0,148 |
| A3 | 0,507 | -0,534 | -0,121 | 0,164 |
| A4 | -0,0453 | -0,0604 | -0,0936 | 0,0875 |
| A5 | 0,530 | >0,01 | 0,119 | 0,413 |
| A1A2 | -0,0169 | -0,175 | 0,013121 | 0,0248 |
| A1A3 | -0,0316 | -0,219 | 0,0558 | 0,0833 |
| A1A4 | 0,220 | -0,0266 | 0,110 | 0,478 |
| A1A5 | -0,403 | -0,3012 | 0,126 | 0,0907 |
| A2A3 | 0,199 | -0,580 | 0,0293 | 0,215 |
| A2A4 | -0,979 | -0,368 | 0,0760 | -0,233 |
| A2A5 | 0,166 | -0,0410 | 0,0870 | 0,181 |
| A3A4 | 0,224 | 0,732 | 0,117 | 0,207 |
| A3A5 | -0,428 | 0,142 | 0,0152 | 0,217 |
| A4A5 | >0,01 | 0,445 | 0,0780 | -0,289 |

Coeficientes A0: média da concentração; A1: massa; A2: tempo de extração; A3: número de ciclos; A4: temperatura; A5: flush. Solventes utilizados: H: hexano, HD: sol. hexano: DCM (1:1), DCM: diclorometano, AE: acetato de etila.

A média da concentração (**A0, Tabela XL**) de ácidos graxos livres em amostras extraídas por diferentes solventes utilizando PLE mostrou que a ordem crescente de concentração de ácidos graxos é dada do seguinte modo: DCM<AE<HD<H. Provavelmente, a concentração de ácido graxos livres nas amostras extraídas é dada pela afinidade do solvente, ou seja, os triglicerídeos da amostra extraída com DCM são extraídos facilmente pelo solvente que não dá tempo de quebra entre o glicerol e a molécula de ácido graxo..

A massa influencia de forma positiva aumentando a quantidade de ácidos graxos presentes na amostra, quando se passa de 1 para 3 gramas em extrações com hexano, hexano/DCM e DCM. Este efeito é sentido de maneira mais intensa nas amostras com hexano que aumenta 0,53 % da concentração destes analitos.

O tempo só mostra ter influência em amostras extraídas com hexano e hexano/DCM, porém essa influência é dada de forma negativa, ou seja, diminui a concentração com maior tempo de extração.

O número de ciclos é mostrado de maneira negativa para as amostras extraídas com hexano/DCM e DCM, porém para as amostras extraídas com hexano esse efeito é positivo fazendo com que as amostras tenham a tendência de aumentar a sua concentração em 0,5 % quando se passa de 1 para 3 ciclos de extração.

A temperatura age de forma significativa e negativa para as amostras extraídas com hexano/DCM e DCM, mostrando que mesmo a temperatura de 100°C não há formação de ácidos graxos livres se extraído em até 30 minutos.

O flush age de forma contrária aumentando a concentração de ácidos graxos a medida que se passa de 30 % para 150 %. Esse efeito é visto com maior intensidade na amostras extraídas com hexano (0,53 %).

Embora a temperatura não seja vista como uma variável que causa grande influência na extração quando apresentada individualmente. Quando se analisa a interação dela com outras variáveis como massa, tempo e número de ciclos verifica-se que ela influencia todas amostras extraídas por PLE de maneira significativa. A temperatura quando interage com outras variáveis é responsável pelos coeficientes com maior intensidade.

Em amostras extraídas com hexano o efeito é positivo quando a massa e o número de ciclos interagem com a temperatura, ou seja, esse efeito aumenta a concentração de ácidos graxos livres em 0,2 %. Já para a interação tempo/temperatura este efeito é negativo e tem uma tendência de diminuir 0,9 % da concentração dos analitos.

Para as amostras com hexano/DCM os efeitos se apresentam de forma negativa para as interações massa/temperatura e tempo/temperatura, mostrando que a amostra terá menor concentração de ácidos graxos livres. Já quando estudamos a interação entre número de ciclos e temperatura verificamos que há uma tendência em que as amostras aumentem em 0,73 % a concentração quando temos estas duas variáveis atuando em seus maiores níveis.

Em amostras extraídas com DCM as interações entre massa/temperatura, tempo/temperatura e ciclos/temperatura mostram ter um efeito significativo positivo que aumenta o número de ácidos graxos em 0,1 %. Com este comportamento verifica-se que, com solvente que possui um menor ponto de ebulição, a tendência de extrair ácidos graxos livres é maior que nos demais solventes quando se eleva a temperatura em conjunto com outras variáveis.

As amostras extraídas com acetato de etila apresentaram coeficientes positivos para a interação entre massa/temperatura (0,48 %) e número de ciclos/temperatura (0,20 %). Já para a interação entre a temperatura/tempo é dada de forma negativa mostrando um decréscimo na concentração de ácidos graxos nas amostras (0,28 %).

A concentração de ésteres metílicos foi inferior a 0,01 % para todas as extrações por isso não foi realizado o estudo de efeitos no planejamento experimental levando em consideração esses analitos como resposta.

4.2.2.3 ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA EXTRAÍDOS POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

A quantificação da fração não ligada ao glicerol em amostras extraídas por SFE foi realizada selecionando amostras de cada método de extração. A metodologia de análise seguiu o mesmo padrão empregado para a extração por prensagem, Soxhlet e

PLE. A **Figura 27** apresenta a soma das concentrações de ésteres metílicos, ésteres etílicos e ácidos graxos presentes na fração não ligada ao glicerol.

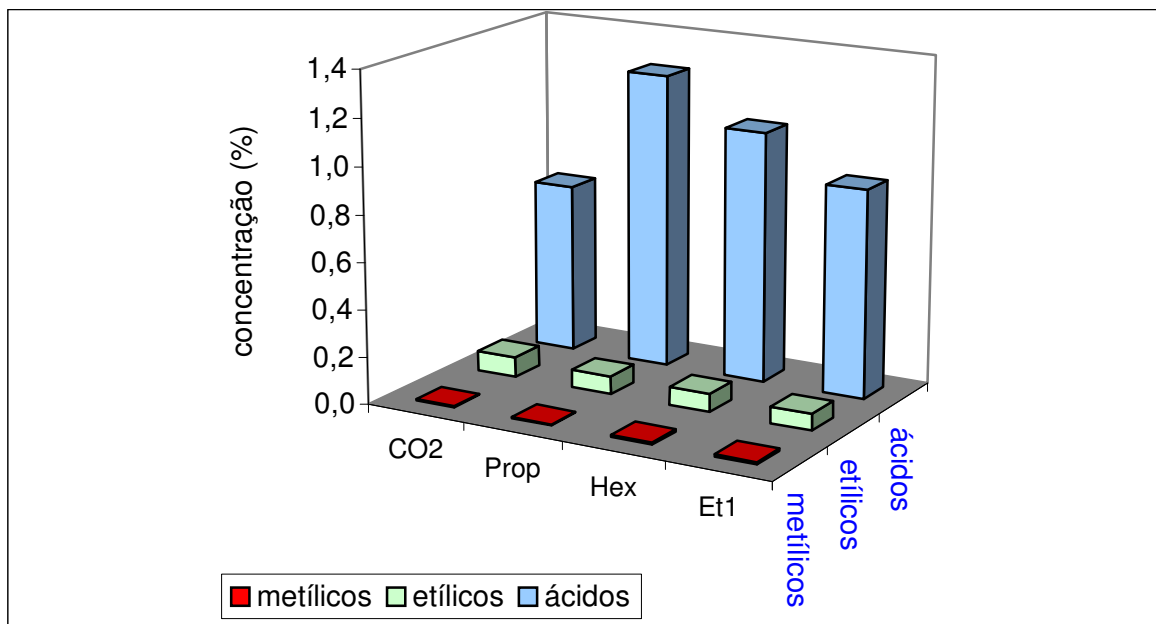


Figura 27: Análise quantitativa de compostos não ligados ao glicerol em amostras de óleo de semente de uva extraídas por SFE.

Através dos dados apresentados na **Figura 27** confirma-se a presença de uma pequena quantidade de ésteres metílicos, aproximadamente $0,007 \% \pm 0,002$. Esse valor é aproximadamente o mesmo encontrado nas demais amostras de óleo de semente de uva analisadas, o que sugere que esses compostos não estão sendo influenciados pelo método de extração.

A concentração de ésteres etílicos é superior a de ésteres metílicos, chegando a $0,08 \% \pm 0,01$ para todas as amostras extraídas por SFE. A quantidade encontrada nessa amostra esta dentro da faixa de concentração encontrada para outros métodos de extração.

Os ácidos graxos livres presentes no óleo de semente de uva estão distribuídos de forma distinta entre as amostras extraídas com SFE. A extração com SFE utilizando CO_2 , como solvente extrator, apresentou a menor concentração ($0,72 \%$), enquanto que

a extração com propano, apresentou 1,26 %. Tendo em vista o tempo de extração, 220 minutos e 30 minutos, respectivamente, o propano se mostrou melhor solvente extrator que o CO₂ para esses analitos.

As amostras utilizando etanol como solvente modificador apresentaram concentração de 0,89 % enquanto que a amostra extraída com 10 % de hexano obteve uma concentração de 1,07 % de ácidos graxos livres presentes. Nesse caso se repetiu a tendência dos demais solventes extratores, sendo que o solvente de menor polaridade conseguiu uma melhor extração que o solvente de maior polaridade.

A influência da polaridade do solvente, na extração de óleo de semente de uva com maior concentração de ácidos graxos, utilizado é percebida até mesmo quando comparado todas as amostras extraídas por SFE, sendo que a concentração de ácidos graxos livres é maior para o solvente com propriedades apolares (propano).

4.2.2.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE A FRAÇÃO INSAPONIFICÁVEL NOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA

As amostras apresentaram semelhantes concentrações de ésteres metílicos, não ultrapassando 0,01 % do total dos analitos, presentes nas amostras de óleo de semente de uva.

A concentração, de ésteres etílicos, variou entre 0,002 e 1 %, sendo que amostras que apresentaram maior concentração, foram amostras de óleo de semente de uva extraídos por PLE, mostrando que a pressão utilizada neste método de extração auxilia na extração destes ésteres.

A análise de ácidos graxos livres, presentes nas amostras extraídas com a mistura de sementes de uva Isabel e Herbemont, mostrou que a amostra extraída por PLE a 100°C, com 3 ciclos de extração de 30 minutos apresentou o maior a concentração.

4.2.3 TRIACILGLICEROL (TG)

4.2.3.1 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA

As análises de triglicerídeos nas amostras de óleos de sementes de uvas foram realizadas segundo o método da AOAC que identifica os triglicerídeos presentes nas amostras pela relação entre o número de carbonos e o número de duplas ligações existente em cada ácido graxo que compõe o triglicerídeo. O método da AOAC está descrito no capítulo da experimental, **página 51**, e serve como alternativa para cálculo dos triglicerídeos, visto que ainda não existem padrões comerciais para todos os triglicerídeos. Os padrões utilizados foram a trilaurina (LaLaLa), a tripalmitina (PPP), triestearina (StStSt), a trioleína (OOO) e a trilinoleína (LLL).

O óleo de soja, que já é estudado pela literatura, serviu como amostra de referência para este trabalho. Para confirmar a presença de triglicerídeos a **Figura 28** apresenta a comparação do óleo de soja e alguns padrões comerciais.

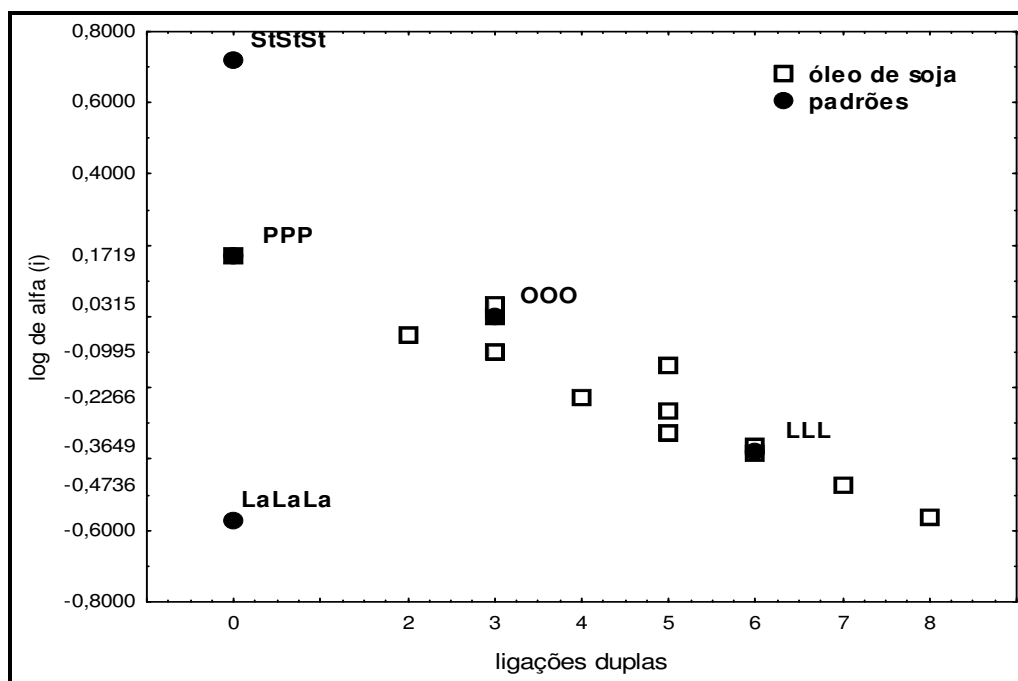


Figura 28: Representação gráfica do óleo de soja e dos padrões de triglicerídeos. La: láurico, P: palmítico, L: linoléico, O: oléico, St: esteárico.

Ao avaliar o resultado da comparação, entre o óleo de soja e os padrões pode-se verificar que existem as sobreposições dos pontos, onde os compostos estão presentes nas amostras. Através do gráfico da AOAC (**Tabela XVI, página 55**), verifica-se que existe uma linearidade entre as duplas ligações em relação ao tempo de retenção relativo ($\log \alpha (i)$). O mesmo procedimento foi adotado para a comparação entre o óleo de semente de uva comercial e o óleo de soja. Na **Figura 29** são apresentados os resultados obtidos com a comparação do óleo de soja e óleo de semente de uva para fins farmacêuticos (B).

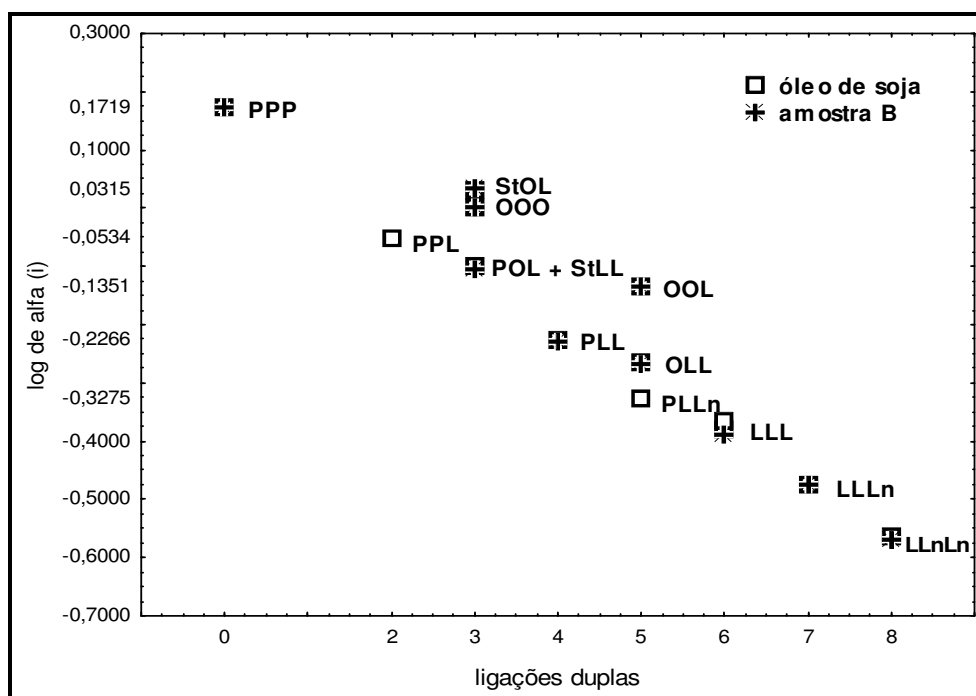


Figura 29 : Representação gráfica do óleo de soja e da amostra para fins farmacêuticos (B). P: palmítico, L: linoléico, O: oléico, Ln: linolênico, St esteárico.

Embora as duas amostras tenham muita semelhança, existem dois triglicerídeos (PPL e PLLn) não encontrados no óleo de semente de uva comercial.

4.2.3.2 ANÁLISE DE TRIACILGLICEROL NOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA COMERCIAIS E OBTIDOS POR TÉCNICAS CLÁSSICAS (PRENSAGEM E SOXHLET)

Os resultados quantitativos das amostras de semente de uva para fins alimentícios (A), para fins farmacêuticos (B) e as demais amostras extraídas por prensagem serão apresentadas na **Tabela XLI**.

Tabela XLI: Concentração de triglicerídeos em óleos comerciais de semente de uva e extraídos por prensagem e Soxhlet, expressos em porcentagem.

| ECN | nome | Isabel/Herbemont | | comerciais | |
|-----|------------|------------------|---------|------------|-------|
| | | prensa | Soxhlet | A | B |
| 38 | LLnLn | ND | 0,12 | 0,14 | 0,04 |
| 38 | Isômero | ND | 0,07 | ND | ND |
| 40 | LLLn | 0,58 | 0,67 | 0,42 | 0,68 |
| 40 | Isômero | ND | 0,18 | 0,07 | ND |
| 42 | LLL | 40,54 | 41,53 | 39,78 | 37,28 |
| 42 | PLLn | 0,27 | ND | ND | ND |
| 44 | OLL | 21,12 | 20,66 | 22,08 | 22,33 |
| 44 | PLL | 14,09 | 13,64 | 14,06 | 13,53 |
| 46 | OOL | 5,40 | 5,41 | 5,90 | 6,52 |
| 46 | POL + StLL | 12,20 | 11,58 | 12,75 | 12,84 |
| 46 | PPL | 0,16 | 0,27 | ND | ND |
| 48 | OOO | 1,08 | 1,25 | 0,83 | 1,83 |
| 48 | StOL + (?) | 3,52 | 3,44 | 3,55 | 4,06 |
| 48 | (POP) | 0,41 | 0,60 | ND | ND |
| 48 | PPP | 0,46 | 0,26 | 0,42 | 0,89 |
| ? | ? | ND | ND | ND | ND |
| ? | ? | 0,18 | ND | ND | ND |

** (A) amostra comercial alimentícia, (B) amostra comercial farmacêutica;
(P) palmítico, (L) linoléico, (O) oléico, (St) esteárico e (Ln) linolênico. ND: não detectado

Através da **Tabela XLI** verifica-se a semelhança de resultados quanto aos triglicerídeos presentes em maior concentração nos óleos de sementes de uva. O triglicerídeo majoritário é a trilinoleína (LLL), seguindo de outros triglicerídeos (OLL, PLL e StLL + POL) que contém o ácido linoléico ligado a molécula de glicerol, confirmando assim os resultados da análise de ácidos graxos totais que mostra a grande concentração deste ácido graxo.

O exemplo apresentado na metodologia da AOAC mostra o triacilglicerol StOL e não identifica o outro triglicerídeo que coelui, porém ao observar o gráfico de número equivalente de carbono (ECN), apresentado na parte experimental (página 55), constata-se que o possível triacilglicerol coeluído seja composto de um ácido graxo esteárico, um palmítico e um linoléico (StPL) ou um ácido graxo palmítico e dois oléicos (POO). O estudo baseado no triângulo de separação de triglicerídeos (TST) (página 55), afirma que o StOL possui na soma de seus ácidos graxos 54 carbonos e 3 ligações duplas o corresponde ao ECN 48, por isso os triglicerídeos que podem coeluir com ele devem ter este mesmo ECN 48 e n° de carbonos 52 e 2 ligações duplas.

Esta questão só poderia ser solucionada com a separação total dos picos e a confirmação através de padrões dos triglicerídeos, StPL e POO. Estudos da literatura quando discutem a coeluição destes picos apontam diferentes soluções para este problema, porém ainda não foi confirmada com a comparação de padrões.

As amostras comerciais e amostras extraídas por prensagem e Soxhlet das variedades Isabel/Herbemont possuem aproximadamente 40% de trilinoleína (ECN 42). Os resultados das amostras são apresentados através da **Figura 30**.

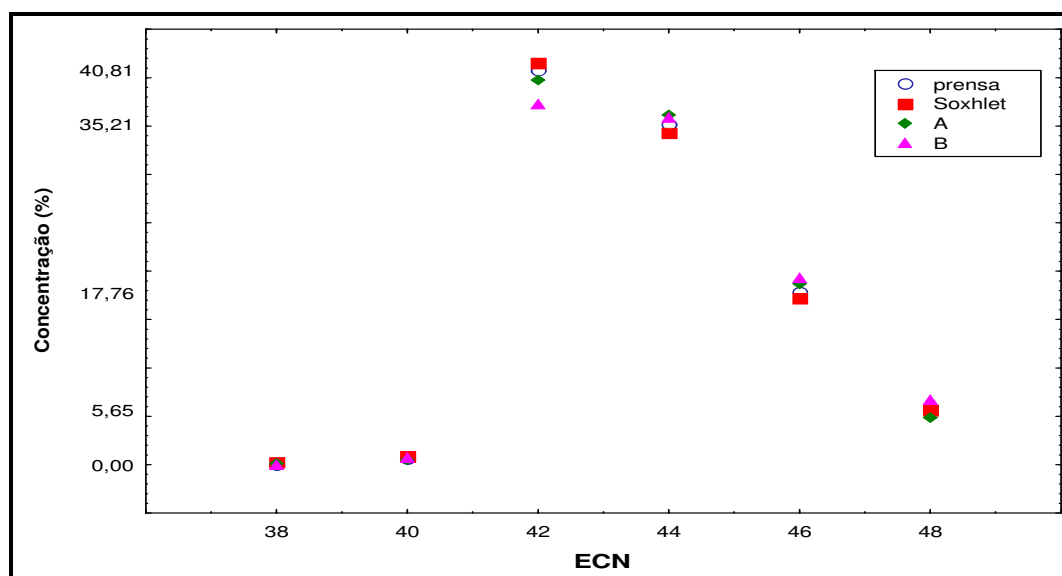


Figura 30: Gráfico da relação entre número equivalente de carbonos (ECN) e percentual de triglicerídeos para amostras comerciais (A) amostras para fins alimentícios (B) para fins farmacêuticos e amostras extraídas por prensagem e Soxhlet.

A trioleína (OOO), ECN 48, no óleo comercial B, é dada em maior quantidade que nas outras amostras, porém as amostras apresentaram concentração em torno de $5,65 \pm 0,82 \%$, mostrando que a diferença é mínima entre as amostras. A concentração dos triglicerídeos que compõe ECN 38 (LLnLn) e ECN 40 (LLLn) são semelhantes entre si e possuem valores próximos a zero.

Existem mais dois triglicerídeos que aparecem em algumas amostras de óleo de semente de uva que não são identificados na amostra de óleo de soja. Esses dois picos são eluídos após a PPP e por isso ao comparar a ordem de eluição dos picos presentes nas amostras de óleo de soja e óleo da semente de uva **Figura 31**, dada pelo TST, esses compostos deverão possuir ECN igual ou maior que 50.

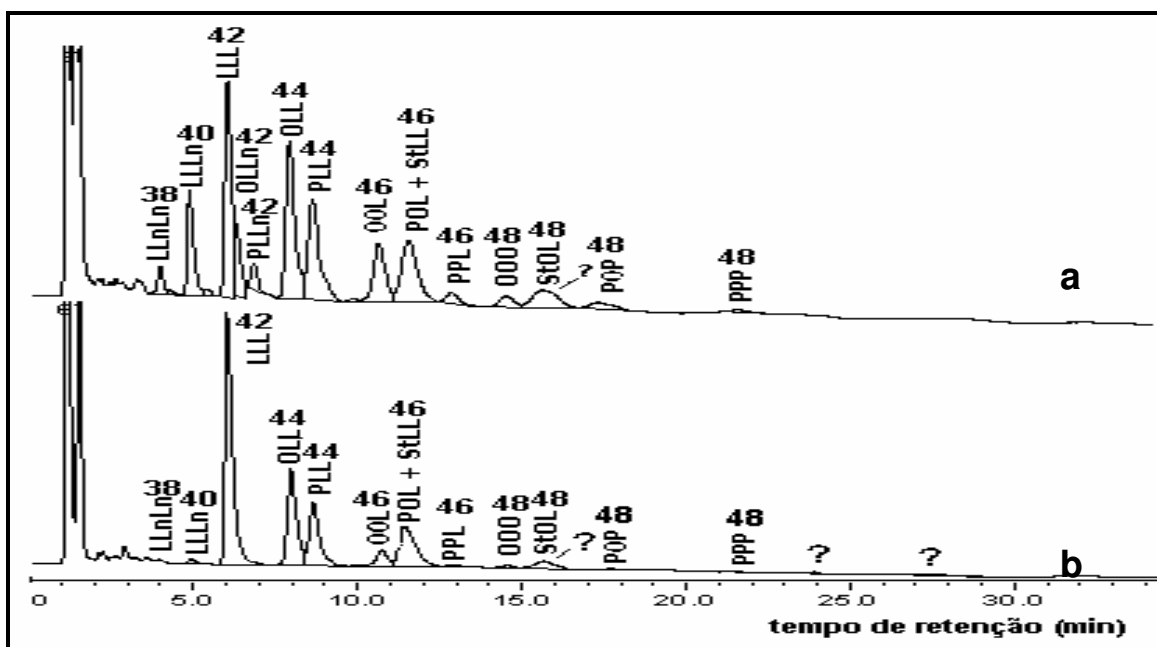


Figura 31: Cromatogramas da análise de triglicerídeos em (a) óleo de soja e (b) óleo de semente de uva Isabel/Herbemont; Condições cromatográficas citadas na **Seção 3.6.3.3, pág 54**. ECN: número equivalente de carbonos.

De acordo com Waner e colaboradores [140], ocorre um decréscimo de ácido linoléico e oléico em óleo vegetais que sofrem aquecimento, por isso pretende-se avaliar se em amostras óleo de semente de uva extraída por Soxhlet, ocorre a perda ou o decréscimo de triglicerídeos na amostra. Os resultados estão apresentados na **Tabela**

XLII, na qual verifica a ausência dos dois compostos que saem após a eluição da tripalmitina (PPP), assim como a do triglicerídeo PLLn. Os resultados também confirmam a maior quantidade de LLL no óleo de semente de uva.

Os resultados obtidos da análise de triglicerídeos nas amostras extraídas em Soxhlet mostraram pouca diferença quantitativa em relação às amostras extraídas por prensagem, por isso pode-se dizer que a temperatura de extração ($\pm 70^{\circ}\text{C}$) utilizada não é suficiente para que ocorra grande alteração da concentração de triglicerídeos no óleo.

4.2.3.3 ANÁLISE DE TRIACILGLICEROL NOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA EXTRAÍDOS COM LIQUIDO PRESSURIZADO

Amostras extraídas por PLE com hexano, solução de hexano:DCM (1:1), DCM e acetato de etila apresentam os resultados semelhantes aos óleos extraídos por prensa e Soxhlet, sendo assim, faz-se necessário a análise de resultados apenas pelo expressão gráfica de ECN X concentração de triglicerídeos (%). As tabelas, com os dados percentuais, de cada triglicerídeos encontram-se no **Anexo III**. Os resultados obtidos para as amostras estão apresentados nas **Figuras 32, 33, 34 e 35**, respectivamente.

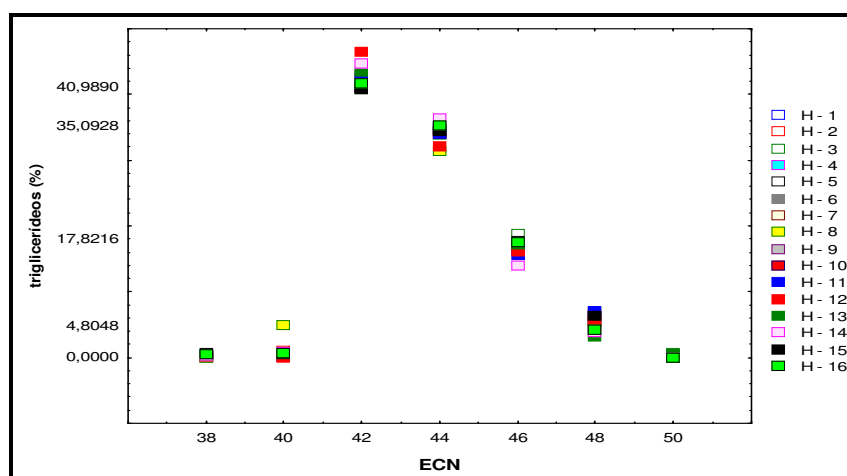


Figura 32 : Quantificação dos triglicerídeos, expresso em ECN, nas amostras de óleo de semente de uva extraída por PLE em hexano.

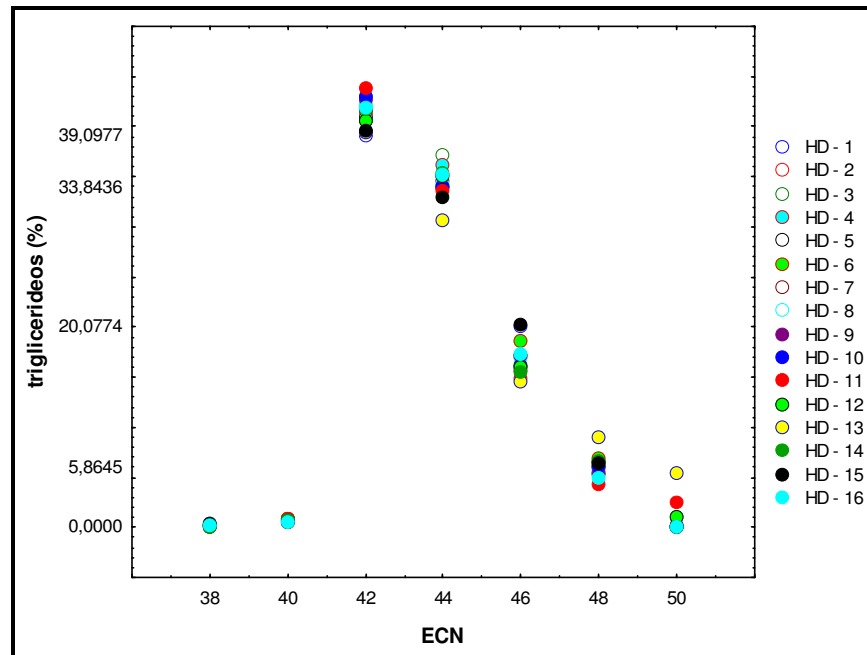


Figura 33 : Quantificação dos triglicerídeos, expresso em ECN, nas amostras de óleo de semente de uva extraída por PLE em solução de hexano: DCM (1:1).

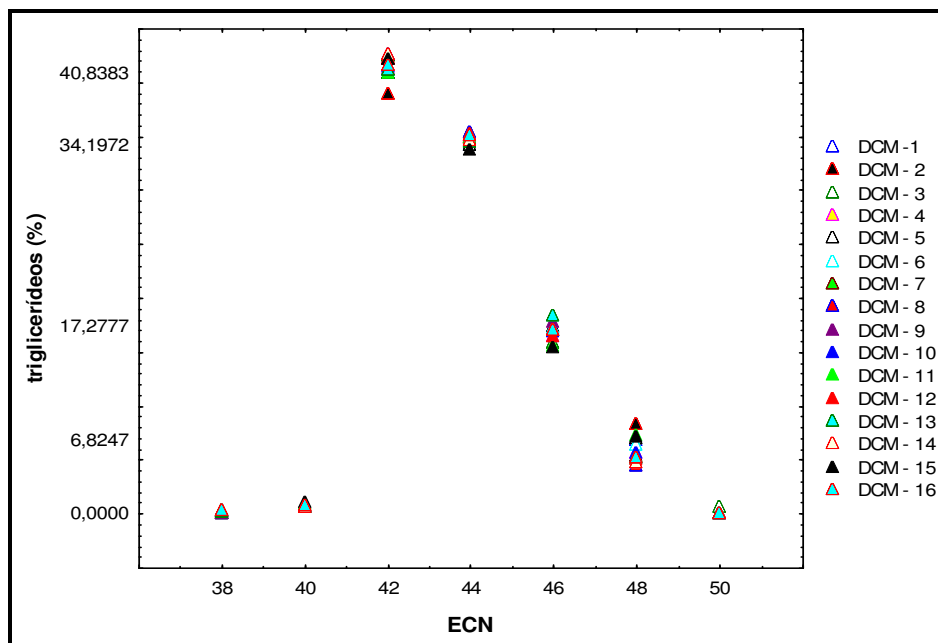


Figura 34 : Quantificação dos triglicerídeos, expresso em ECN, nas amostras de óleo de semente de uva extraída por PLE em DCM.

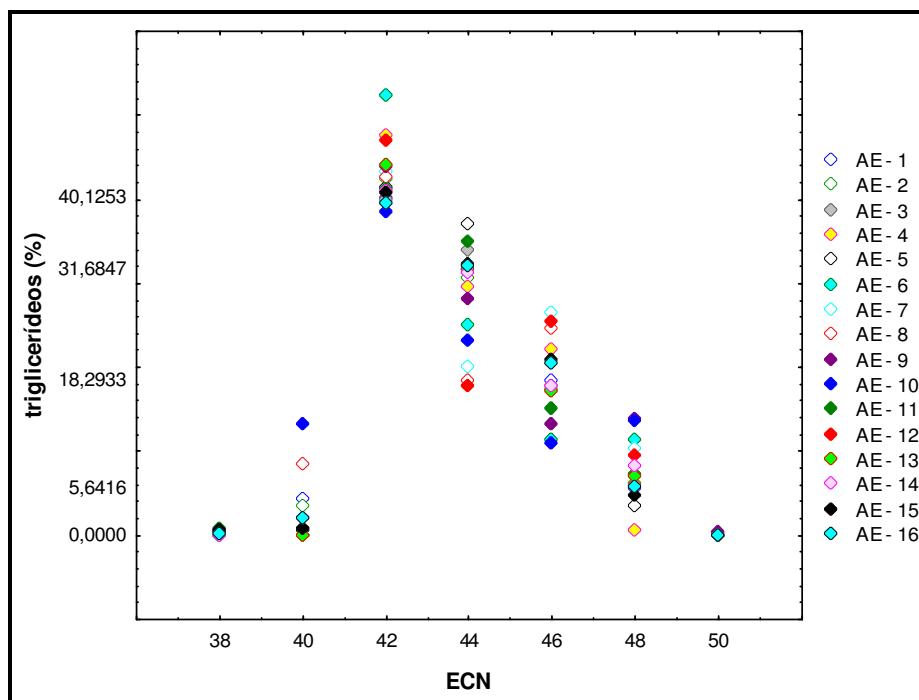


Figura 35 : Quantificação dos triglicerídeos, expresso em ECN, nas amostras de óleo de semente de uva extraída por PLE em acetato de etila.

As amostras extraídas por PLE apresentaram o mesmo perfil cromatográfico variando somente o desvio padrão entre as amostras, dentro do grupo extraído pelo mesmo solvente. O ECN – 42 para todas as amostras permaneceu em torno de 41 %, enquanto que para o ECN – 46 que está na faixa dos 17 %.

Para ECN – 44 as amostras extraídas com a solução de hexano, hexano: DCM (1:1) e DCM o resultado encontrado está em torno de 34 %, porém as amostras com acetato de etila apresentaram grande variação de 18 % a 40 % , tendo o valor médio de 28,5 %.

O ECN – 48 ocupa a 4ª posição e possui aproximadamente 5,5 % de triglicerídeos presentes em óleo de sementes de uva extraídos com hexano, solução de hexano:DCM (1:1) e DCM. As amostras extraídas com acetato de etila apresentaram grande variação nos seus resultados e obtiveram como valor médio 7,5 %.

As amostras extraídas com hexano, solução de hexano: DCM e DCM apresentaram valores muito baixos para o ECN – 40, próximos a zero. Porém nas amostras extraídas com acetato de etila a concentração variou significativamente. Os

triacilgliceróis que possuem ECN – 50 também tiveram sua concentração alterada em amostras extraídas com a solução de hexano:DCM (1:1).

Algumas amostras são responsáveis por apresentar comportamento diferenciado das demais extraídas com o mesmo solvente. Dentre essas amostras está o óleo de semente de uva extraído com hexano em 3 ciclos de 30 minutos à 25°C (H - 8) que apresenta o maior valor de ECN – 40 e o menor para ECN – 44.

Entre as amostras extraídas com a solução de hexano:DCM (1:1) obtivemos os maiores valores de ECN – 48 e ECN – 50 para a amostra HD – 13, essa mesma amostra é responsável por apresentar os menores valores para ECN – 44 e ECN 46.

As amostras com DCM apresentaram grande uniformidade em seus resultados, porém a amostra de DCM – 15 se diferenciou um pouco do grupo quando apresentou menor valor para ECN 42.

A amostra extraída em acetato de etila com 3 ciclos de extração de 10 minutos com a temperatura de 25°C (AE – 6) apresentou a maior quantidade de ECN 42, devido a alta concentração de LLL. Enquanto que o óleo de semente de uva, AE – 10, apresentou maior valor de ECN – 40. O conjunto de amostras que apresentaram maior variabilidade no ECN, foram as amostras extraídas com acetato de etila. Porém todas as amostras estão dentro da faixa de desvio estabelecido pela AOAC para a análise de triglicerídeos em óleos vegetais.

Tendo em vista a pouca diferença de concentração de triglicerídeos entre as amostras extraídas por PLE, faz-se uso da ferramenta estatística para melhor compreender qual a melhor condição de extração e quais efeitos que cada condição tem sobre os analitos majoritários. Como a concentração de triglicerídeos é dada em função do número equivalente de carbonos (ECN) utilizou-se para essa análise o ECN – 42, ECN – 44 e ECN – 46.

Para estudar a influência da massa, tempo de extração, número de ciclos, temperatura e flush, na análise de triglicerídeos, faz-se uso da **Equação 4**, página 62. A equação geral e os valores dos seus respectivos coeficientes estão apresentados nas Tabelas subseqüentes, fazendo as devidas discriminações para os coeficientes que se mostraram significativos (negrito).

Quando é feita a análise de ECN – 42, em realidade faz-se o somatório da concentração de trilinoleína (LLL) e do linoleoilpalmitoil linolenioilglicerol (PLLn), devido ao fato de serem os únicos triglicerídeos presente no óleo de semente de uva com essa classificação. Os coeficientes obtidos para a análise de ECN – 42 em amostras extraídas com hexano, solução de hexano:DCM, DCM e acetato de etila estão apresentados na **Tabela XLII**.

Tabela XLII: Coeficientes dos modelos construídos para ECN-42 em amostras de óleos extraídas por PLE.

| coeficiente | H | HD | DCM | AE |
|-------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| A0 | 41,5 | 41,2 | 41,5 | 42,8 |
| A1 | 1,64 | 0,432 | 0,118 | 2,00 |
| A2 | 0,868 | 0,506 | 0,998 | -0,218 |
| A3 | -1,22 | -0,782 | 0,491 | 0,536 |
| A4 | 2,63 | 0,689 | 0,293 | -1,78 |
| A5 | -0,0637 | -0,08 | -0,248 | 0,936 |
| A1A2 | -0,116 | -0,461 | 0,113 | 0,826 |
| A1A3 | 0,901 | 0,475 | 0,271 | -0,528 |
| A1A4 | -0,581 | -0,0327 | 0,483 | - 3,06 |
| A1A5 | - 2,38 | -0,0664 | 0,216 | 0,316 |
| A2A3 | -0,188 | 0,439 | -0,303 | - 2,92 |
| A2A4 | -1,06 | - 0,75 | - 0,896 | 0,476 |
| A2A5 | -0,888 | 1,37 | -0,458 | -0,628 |
| A3A4 | 0,726 | -1,09 | -0,103 | -1,84 |
| A3A5 | 1,60 | -0,44 | -0,306 | 2,37 |
| A4A5 | -1,52 | 1,03 | -0,643 | -3,33 |

Coeficientes A0: média da concentração; A1: massa; A2: tempo de extração; A3: número de ciclos; A4: temperatura; A5: flush. Solventes utilizados: H: hexano, HD: sol. hexano: DCM (1:1), DCM: diclorometano, AE: acetato de etila.

A análise de ECN – 44 compreende o somatório da concentração de linoleoiloleoil linoleoilglicerol (OLL) e linoleoilpalmitoil linoleoilglicerol (PLL), devido ao fato de serem os únicos triglicerídeos presente no óleo de semente de uva com esta

classificação. Os coeficientes obtidos para a análise de ECN – 44 em amostras extraídas com hexano, solução de hexano:DCM, DCM e acetato de etila estão apresentados na **Tabela XLIII**.

Tabela XLIII: Coeficientes dos modelos construídos para ECN – 44 em amostras de óleos extraídas por PLE.

| Coeficiente | H | HD | DCM | AE |
|-------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| A0 | 33,2 | 34,3 | 34,7 | 28,6 |
| A1 | -0,572 | 0,794 | 0,418 | -5,25 |
| A2 | 1,06 | 1,11 | 0,266 | -2,46 |
| A3 | 0,665 | -0,678 | -0,308 | -0,245 |
| A4 | 2,41 | -1,06 | 0,0587 | 0,682 |
| A5 | 2,84 | -0,565 | 0,0187 | -0,160 |
| A1A2 | -0,100 | -0,324 | 0,131 | -0,597 |
| A1A3 | 2,43 | 0,604 | 0,156 | 1,68 |
| A1A4 | 0,570 | 1,37 | 0,0287 | -0,515 |
| A1A5 | 0,930 | 0,755 | -0,0812 | 3,09 |
| A2A3 | -0,642 | -0,405 | 0,0637 | -3,00 |
| A2A4 | -2,05 | -0,468 | -0,328 | 3,15 |
| A2A5 | -1,14 | 0,695 | 0,126 | 3,69 |
| A3A4 | 0,877 | 0,105 | -0,258 | 6,07 |
| A3A5 | -0,467 | 0,0545 | 0,236 | -2,42 |
| A4A5 | -2,73 | -0,341 | 0,233 | 3,30 |

Coeficientes A0: média da concentração; A1: massa; A2: tempo de extração; A3: número de ciclos; A4: temperatura; A5: flush. Solventes utilizados: H: hexano, HD: sol. hexano: DCM (1:1), DCM: diclorometano, AE: acetato de etila.

Os coeficientes obtidos para a análise de ECN – 44 e 46 em amostras extraídas com hexano, solução de hexano:DCM, DCM e acetato de etila estão apresentados nas **Tabela XLIII e XLIV, respectivamente**.

Tabela XLIV: Coeficientes dos modelos construídos para ECN – 46 em amostras de óleos extraídas por PLE.

| coeficientes | H | HD | DCM | AE |
|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| Ao | 17,7 | 16,9 | 16,8 | 18,5 |
| A1 | -1,34 | -0,458 | 0,0862 | 0,405 |
| A2 | -1,41 | -0,267 | -1,03 | 6,12 |
| A3 | 0,580 | 0,544 | 0,393 | 2,01 |
| A4 | -2,40 | -0,852 | -0,0837 | -1,83 |
| A5 | -1,14 | -0,215 | 0,221 | -1,59 |
| A1A2 | 0,860 | -0,0766 | 0,688 | 2,65 |
| A1A3 | -1,74 | 0,286 | -0,0187 | -2,44 |
| A1A4 | 0,902 | 0,00128 | 0,0237 | 1,63 |
| A1A5 | 1,74 | 0,760 | -0,216 | -3,46 |
| A2A3 | -0,167 | 1,73 | 0,151 | 0,945 |
| A2A4 | 1,77 | 1,56 | -0,356 | -0,465 |
| A2A5 | 0,650 | -0,851 | 0,0987 | 0,445 |
| A3A4 | -0,470 | 0,310 | -0,0937 | 0,860 |
| A3A5 | -0,110 | -0,390 | 0,466 | 0,260 |
| A4A5 | 2,08 | -1,23 | 0,0537 | -1,83 |

Coeficientes A0: média da concentração; A1: massa; A2: tempo de extração; A3: número de ciclos; A4: temperatura; A5: flush. Solventes utilizados: H: hexano, HD: sol. hexano: DCM (1:1), DCM: diclorometano, AE: acetato de etila.

4.2.3.4 ANÁLISE DE TRIACILGLICEROL NOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA EXTRAÍDOS COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

Devido a grande similaridade dos resultados apresentados na maioria das extrações realizada com diferentes solventes, somente algumas amostras de SFE foram analisadas de forma quantitativa quanto ao teor de triglicerídeos. Os dados obtidos das amostras extraídas com fluido supercrítico em CO₂ e propano são apresentados a **Figura 36**.

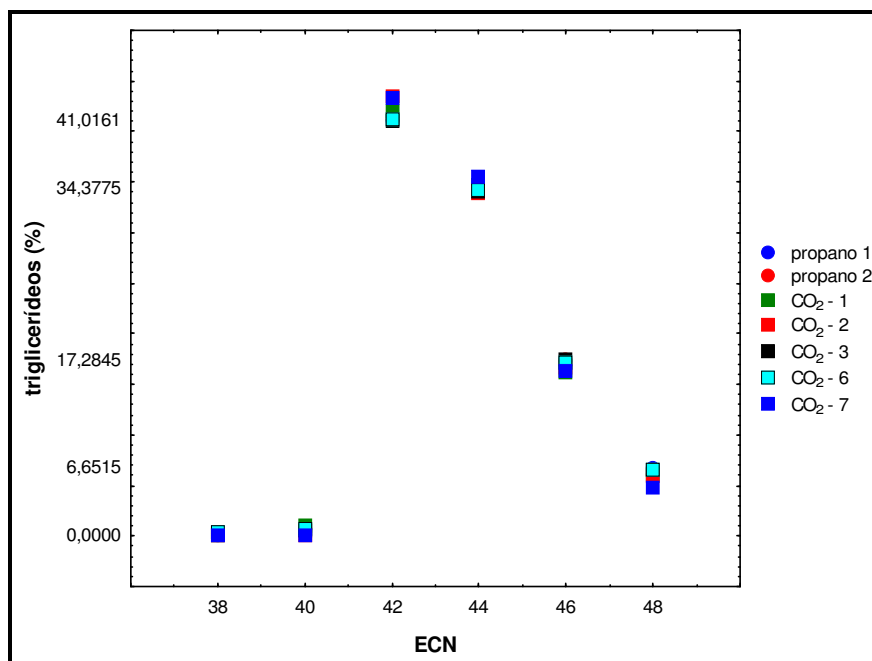


Figura 36: Análise quantitativa de triglicerídeos em amostras extraídas por SFE em CO₂ e propano.

As amostras extraídas com CO₂ e propano como fluido supercrítico apresentam maior similaridade entre os resultados que as amostras extraídas por PLE.

Quando são analisados os resultados das extrações com CO₂, a amostra (CO₂ – 7) extraída com temperatura de 45°C e pressão de 250 bar (densidade reduzida 1,85), apresentou menor valor para ECN - 46 e ECN – 48 e maior valor para ECN – 42 e ECN - 44. O comportamento oposto para a amostra CO₂ – 6, que foi extraída à 45°C e 60 bar (densidade reduzida 0,83).

As demais amostras possuem valores intermediários de densidade reduzida e seus resultados também ficaram entre as amostras CO₂ – 6 e CO₂ – 7. As amostras extraídas com propano não possuem grandes diferenças em termos de densidade entre si e apresentaram o mesmo perfil, quanto ao teor de triacilgliceróis que as amostras extraídas com CO₂.

As amostras extraídas com solventes modificadores apresentaram o mesmo perfil (**Figuras 37 e 38**) que os demais resultados obtidos para a extração do óleo de semente de uva.

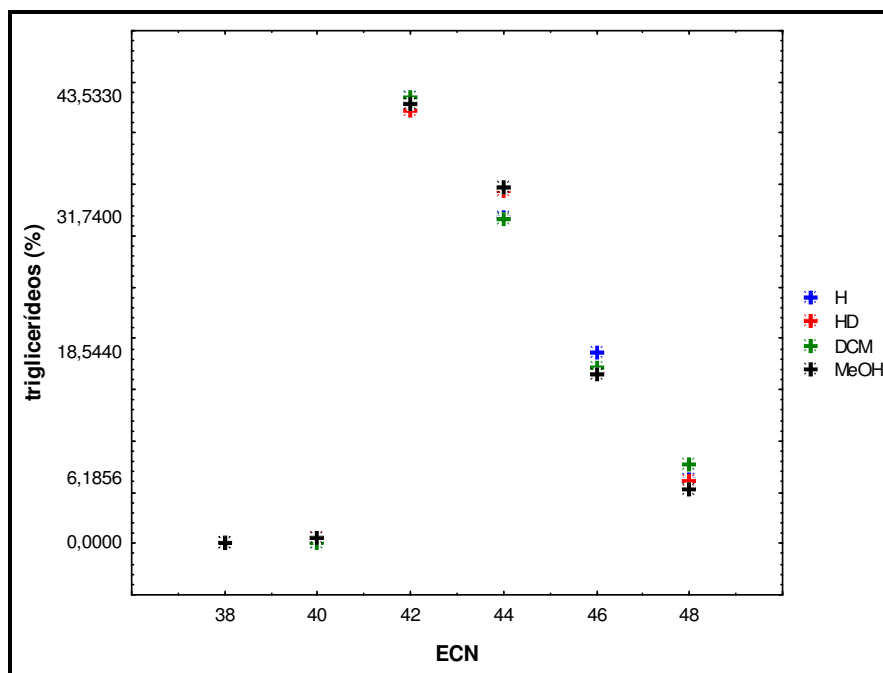


Figura 37: Concentração de triglicerídeos em amostras extraídas por SFE em CO₂ utilizando 10% de solventes modificadores. (H) hexano, (HD) solução hexano:DCM (1:1), (AE) acetato de etila e (MeOH) metanol.

As amostras extraídas com 10 % de solventes modificadores, nas mesmas condições de temperatura e pressão (45°C e 181 bar), apresentaram resultados próximos entre si para cada um dos triglicerídeos analisados. Não foi constatado nenhum triglicerídeo após a tripalmitina (PPP). A análise de triglicerídeos realizada em amostras extraídas com etanol, como solvente modificador em diferentes concentrações, esta apresentada na **Figura 38**.

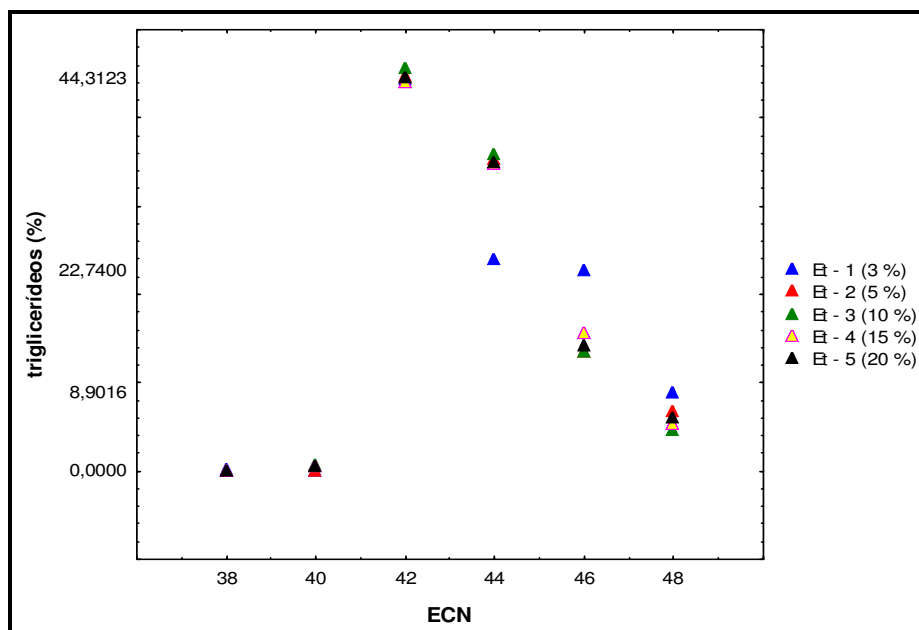


Figura 38: Análise quantitativa de triglicerídeos em amostras extraídas por SFE em CO₂ utilizando etanol como solvente modificador em diferentes concentrações.

Entre as amostras extraídas com etanol a amostra que apresentou comportamento diferenciado foi a extração com 3 % de etanol como solvente modificador. Porém os demais resultados apresentaram grande similaridade, tendo pequenas variações quanto a concentração da trilinoleína (LLL) que é o composto principal dessa amostra.

A média obtida para as extrações de solventes modificadores a 10% e as extrações que utilizaram etanol são de 0,05 % e 0,03 % para ECN – 38, 0,21 % e 0,35 % para ECN – 40; 43,13 % e 44; 58 % para ECN – 42; 32,84 % e 32,93 % para ECN – 44; 17,48 % e 15,88 % para ECN – 46 e 6,30 % e 6,23 % para ECN – 48. Os valores individuais de cada triglicerídeo estão apresentados no **Anexo IV**.

4.2.3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE TRIACILGLICEROL NOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA

As amostras, de óleo de semente de uva, apresentaram o mesmo perfil cromatográfico de triacilgliceróis, em todos os métodos de extração. Entre as variedades

de uvas analisadas foram percebidas poucas diferenças entre a concentração dos analitos.

Entre os métodos de extração o que apresentou maior desvio entre as amostras foi o PLE devido as extrações com acetato de etila.

A maior concentração corresponde a trilinoleína (LLL), a qual se encontra com concentração em torno de 40 % na forma deste triacilglicerol simples, classificado assim por apresentar três ácidos graxos iguais ligados a molécula do glicerol.

Alguns triglicerídeos como PLLn, LLnLn e POP são encontrados com concentração inferior a 1 % e nem sempre são identificados nas amostras de óleo de semente de uva extraída.

4.2.4 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

4.2.4.1 ANÁLISE DE CATEQUINAS

A presença de compostos fenólicos, como catequinas, em óleos vegetais confere propriedades antioxidantes que valorizam o produto comercial, podendo utilizá-los para fins de cosméticos e farmacêuticos e não somente para fins alimentícios. As amostras de óleo de semente de uva foram extraídas e após preparadas como descrito na **Seção 3.5.4**, página 52. A **Figura 39** apresenta exemplos de cromatogramas obtidos com a análise de catequinas em óleo de semente de uva, do padrões e das amostras de óleo obtido por prensagem e por PLE.

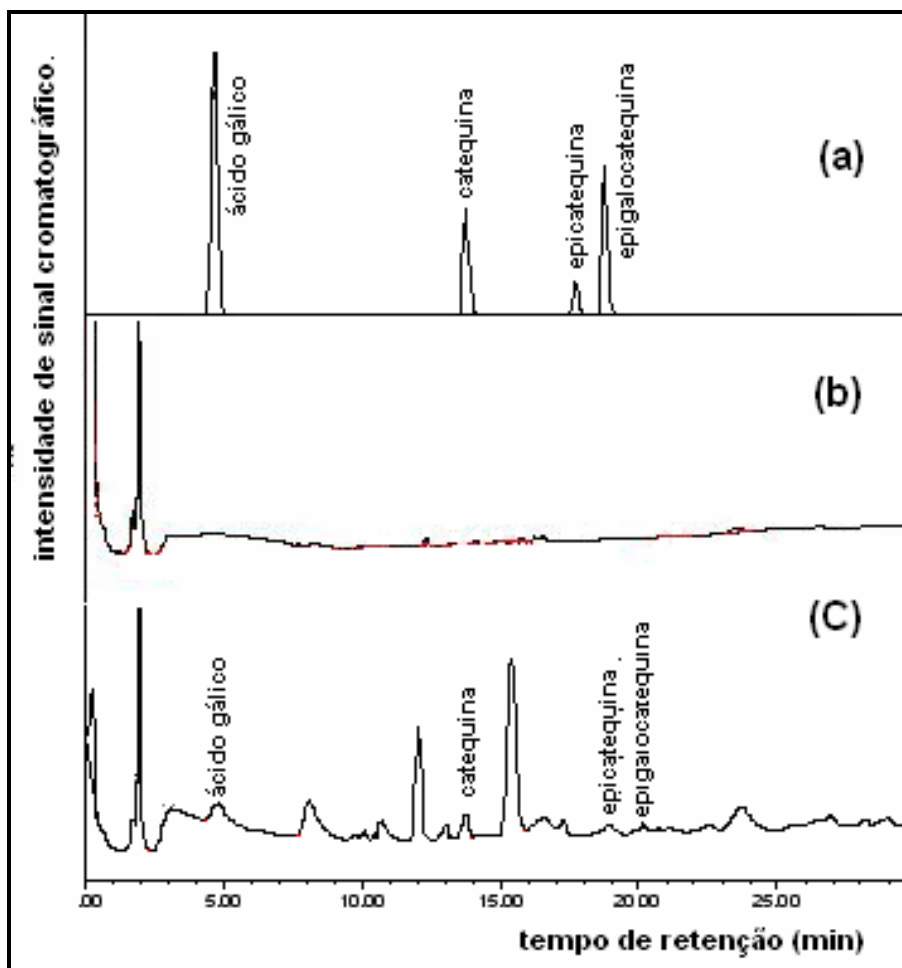


Figura 39: Análise de catequinas em (a) padrão (b) amostra de óleo prensado das uvas Isabel/Herbemont (c) amostra de óleo de semente de uva Isabel/Herbemont extraído por PLE em hexano. *Condição cromatográficas citadas no texto (Seção 3.5.4, pág 52).*

Quando analisado o óleo de semente de uva verificou-se que, em amostras extraídas por prensagem, não foi possível identificar a presença de compostos fenólicos como catequinas. O mesmo comportamento também foi encontrado em óleos extraídos por Soxhlet. Sugere-se que, a quantidade extraída, desses compostos, no óleo de semente de uva, é muito pequena ou se perde ao longo do processo de extração, por isso para uma melhor análise seria necessária uma etapa de pré-concentração da amostra.

Em amostras extraídas por PLE foram identificadas a presença de catequinas no óleo de semente de uva extraído com hexano. Com base nos dados apresentados

na **Figura 39**, verifica-se que o método de extração influenciou significativamente na extração de compostos fenólicos presentes nas sementes de uva. Sabe-se que compostos fenólicos apresentam certa polaridade devido à presença de hidroxilas nas moléculas, por isso a solubilidades destes é maior com solventes polares, o que sugere que para as demais amostras extraídas com diclorometano e acetato de etila a concentração seja maior.

Através do cromatograma (C) apresentado na **Figura 39**, também é possível verificar a presença de outros compostos fenólicos, em maior concentração, que não são identificados neste trabalho.

4.2.4.2 ANÁLISE DE VITAMINA E

4.2.4.2.1 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA

A família da vitamina E confere características antioxidantes importantes para o armazenamento dos óleos vegetais, retardando a rancificação e aumentando a vida útil de prateleira. Além disso, serve como fonte natural para o organismo humano. Essa família tem como componente principal o α – tocoferol por ser encontrado de forma mais abundante e ter suas funções já elucidadas no organismo humano. A análise de α – tocoferol, expresso como vitamina E, nesse trabalho, foi realizada através da injeção direta da amostra, em HPLC, como descrita na **Seção 3.5.4**, página 53.

Neste trabalho foram analisadas amostras de óleo de semente de uva provenientes de diferentes métodos de extração quantificados pelo método de padronização externa. A **Figura 40** apresenta a faixa de linearidade utilizada nesse trabalho, coeficiente de correlação (r^2) e a equação da reta encontrada para o α – tocoferol.

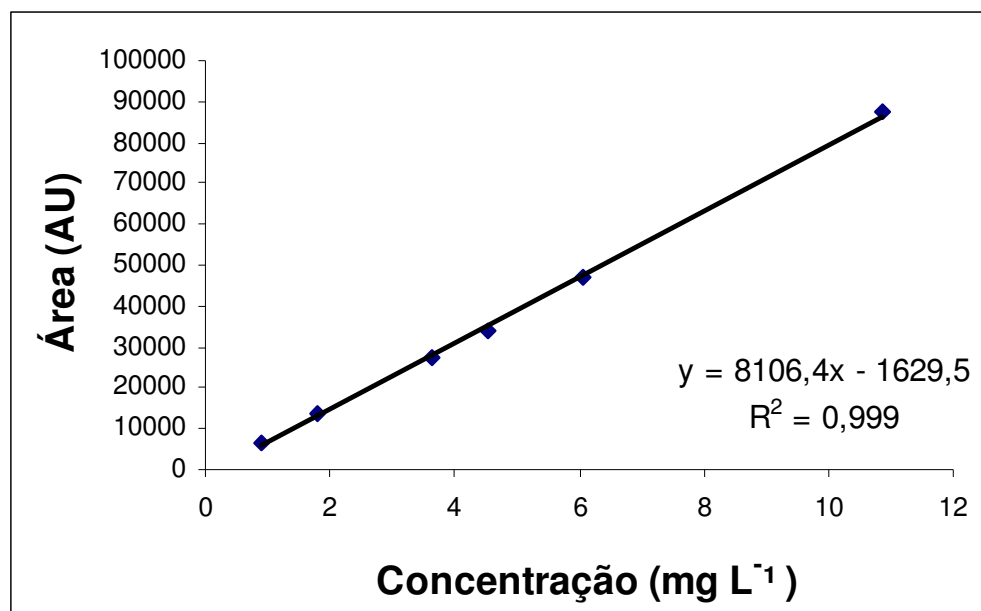


Figura 40: Determinação gráfica da faixa de linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação do α – tocoferol.

Através dos valores apresentados na **Figura 40** pode-se observar que foram obtidos bons resultados na construção da curva de calibração que apresentou coeficiente de correlação superior a 0,99, possibilitando assim a quantificação das amostras por HPLC com detector de UV, nas condições citadas no capítulo experimental. Foram quantificadas amostras comerciais e amostras extraídas nesse trabalho (prensa, Soxhlet, PLE e SFE). Um exemplo dos cromatogramas obtidos com o padrão e com uma amostra de Soxhlet do óleo de semente de uva identificando o α – tocoferol está apresentado na **Figura 41**.

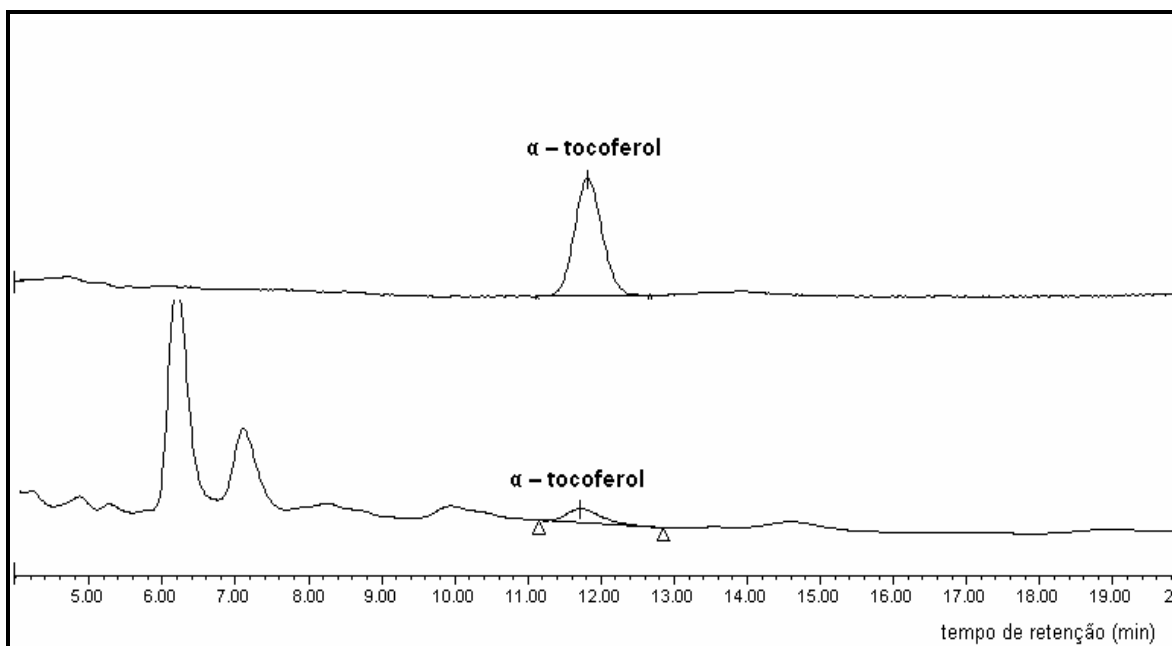


Figura 41 : Cromatogramas da solução padrão de α – tocoferol (a) e de óleo de semente de uva extraída por Soxhlet (b).

Condições cromatográficas: citadas no texto (Seção 3.5.4, pág, 53).

4.2.4.2.2 ANÁLISE DE VITAMINA E NOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA COMERCIAIS E OBTIDOS POR TÉCNICAS CLÁSSICAS (PRENSAGEM E SOXHLET)

Os resultados referentes às análises de amostras comerciais e amostras extraídas de diferentes variedades de sementes de uvas por prensagem e Soxhlet, estão apresentados na **Figura 42**. Nesta figura verifica-se que existe diferença significativa entre as amostras comerciais, para fins farmacêuticos (B) que possui aproximadamente 7 (mg/100g) e óleo para fins comestíveis (A) que se encontra em 2,5 (mg/100g) de vitamina E. A amostra (B) também foi responsável por apresentar maior concentração que as demais amostras analisadas.

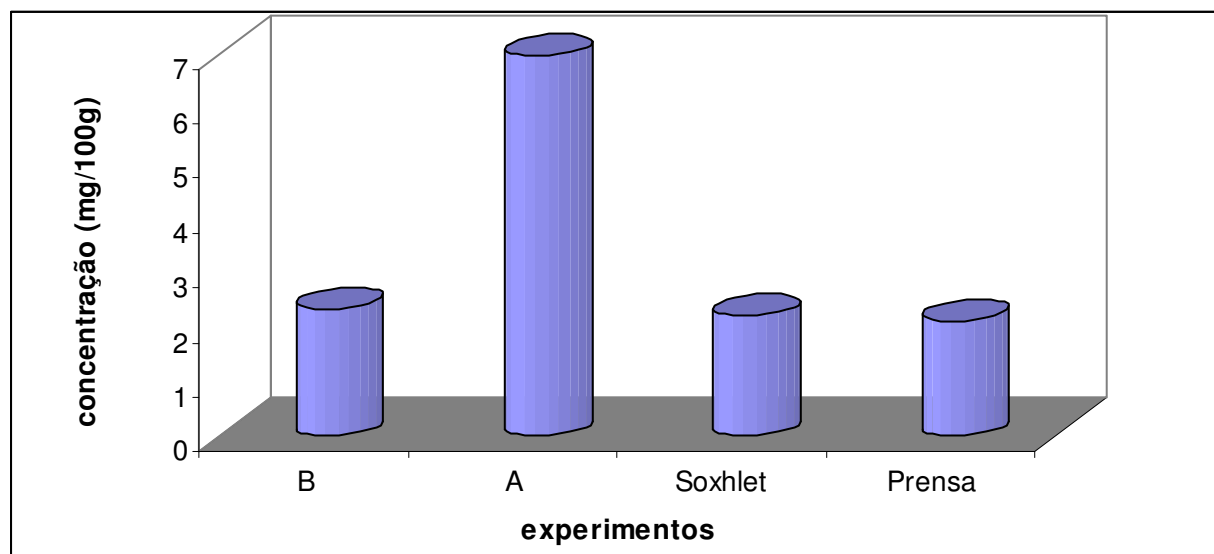


Figura 42: Concentração de α – tocoferol (mg/100g) em amostras comerciais de óleo de semente de uva, (A) amostra para fins alimentícios e (B) amostras para fins farmacêuticos, e amostras extraídas por prensagem e Soxhlet.

A amostra que apresentou maior diferença de concentração de vitamina E, foi a amostra comercial utilizada para fins farmacêuticos. As demais amostras apresentaram resultados semelhantes de concentração (aproximadamente 3%) entre si. Os resultados obtidos sugerem que os óleos para fins farmacêuticos e para fins alimentícios não foram extraídos de sementes do mesma variedade de uva.

4.2.4.2.3 ANÁLISE DE VITAMINA E NOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA EXTRAÍDOS COM LÍQUIDO PRESSURIZADO

A análise dos resultados de quantificação da vitamina E, em amostras extraídas por PLE, de acordo com o planejamento experimental utilizado, é apresentada na **Tabela XX**. Através destes resultados foi construído um modelo experimental para cada solvente. Após a análise dos efeitos foi construído um modelo experimental foi simplificado somente com as variáveis que apresentaram efeitos significativos em cada planejamento para a extração vitamina E no óleo de semente de uva.

Tabela XLV: Concentração de α - tocoferol em amostras, de óleo de semente de uva, extraídas por PLE.

| experimentos | α - tocoferol (mg/100g) | | | |
|--------------|--------------------------------|------|------|------|
| | H | HD | DCM | AE |
| 1 | 1,28 | 2,73 | 2,53 | 1,71 |
| 2 | 1,96 | 2,37 | 1,49 | 1,14 |
| 3 | 4,01 | 2,47 | 1,79 | 1,00 |
| 4 | 0,48 | 2,71 | 0,72 | 0,59 |
| 5 | 1,56 | 2,20 | 1,80 | 2,17 |
| 6 | 0,66 | 1,47 | 1,43 | 1,80 |
| 7 | 1,50 | 2,08 | 1,53 | 2,75 |
| 8 | 1,79 | 2,60 | 1,06 | 1,45 |
| 9 | 1,52 | 2,20 | 2,76 | 2,90 |
| 10 | 1,12 | 1,65 | 2,26 | 0,91 |
| 11 | 2,71 | 0,33 | 0,69 | 0,27 |
| 12 | 2,43 | 1,04 | 1,08 | 0,93 |
| 13 | 1,41 | 0,52 | 1,62 | 3,28 |
| 14 | 2,39 | 2,67 | 2,96 | 1,18 |
| 15 | 2,20 | 1,53 | 1,02 | 0,60 |
| 16 | 2,11 | 1,56 | 0,95 | 3,15 |

*solventes: H: hexano, HD: hexano:diclorometano (1:1), DCM: diclorometano, AE: acetato de etila

O modelo é construído com uma variável dependente e cinco variáveis independentes. A **Equação 8** representa o modelo do planejamento semi-fatorial realizado para o hexano e demais solventes empregados na extração do óleo de semente de uva com vitamina E. Os valores de coeficientes obtidos para cada solvente está apresentado no **Anexo 4**.

$$\text{vitamina E (mg/100g)} = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_4X_4 + A_5X_5 + A_{12}X_1X_2 + A_{13}X_1X_3 + A_{14}X_1X_4 + A_{15}X_1X_5 + A_{23}X_2X_3 + A_{24}X_2X_4 + A_{25}X_2X_5 + A_{34}X_3X_4 + A_{35}X_3X_5 + A_{45}X_4X_5 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde: (X1) massa, (X2) tempo, (X3) ciclos, (X4) temperatura e (X5) flush.

a) análise dos óleos extraídos por PLE com hexano

Dentre as amostras estudadas o experimento 3 (1g de amostra, 1 ciclo, 30 minutos, 25°C e 30 %) apresentou a maior concentração de vitamina E

(4,01 mg/100g). Por outro lado, o experimento 4 (3g de amostra, 1 ciclo, 30 minutos, 25°C e 150 %) apresentou a menor concentração (0,48 mg/100g) deste analito. Ao analisar as condições experimentais destas duas amostras, verifica-se que apenas as variáveis massa e flush foram modificadas. Estas mesmas variáveis são as responsáveis pelo efeito negativo discutidos no modelo proposto para este solvente.

A análise dos efeitos é dada da mesma forma que a análise de rendimento das amostras extraídas por PLE. Sendo que efeitos positivos conferem um acréscimo na concentração da vitamina E e efeitos negativos causam decréscimo na concentração desse analito. A média dos valores analisados é atribuído ao primeiro termo da equação (A0), o qual apresentou para o conjunto de extrações com hexano 1,82 (mg/100g).

A variável que apresentou maior efeito foi o flush (X5), porém esse efeito foi responsável por um decréscimo da concentração de vitamina E de 0,82 (mg/100g) quando modificamos de 25 % a 150 %. Por outro lado o tempo (X2) apresentou um acréscimo de 0,67 (mg/100g) quando o planejamento varia de 10 minutos para 30 minutos, demonstrando através deste modelo que a extração com maior tempo é necessária para a retirada de vitamina E da semente de uva.

A massa (X1) também apresentou efeito negativo de 0,41 (mg/100g) quando o planejamento experimental é alterado de 1 a 3 gramas. Porém, as interações entre as variáveis massa/ciclos (X1X3) e massa/temperatura (X1X4) apresentam efeitos positivos, 0,41 (mg/100g) e 0,46 (mg/100g), respectivamente. Com isso pode-se dizer que com 3 gramas de semente de uva é necessário o uso da temperatura ou do número de ciclos para que haja uma maior recuperação do analito.

A interação entre o flush e a temperatura apresenta um efeito positivo de 0,53 (mg/100g), indicando que uma maior quantidade de solvente a uma temperatura maior a uma melhor extração do analito.

Como foi visto nos dados acima a massa e flush foram as variáveis que alteradas apresentaram um decréscimo de vitamina E no óleo de semente de uva. Embora a massa tenha apresentado um valor negativo, ela demonstrou um valor com menor intensidade em relação ao do flush que também foi apresentado ao modelo através do decréscimo de vitamina E quando se alterasse de 30 a 150 % de flush.

b) análise dos óleos extraídos por PLE com solução hexano:diclorometano (1:1)

Com exceção da variável massa (0,25), as demais variáveis isoladas apresentaram efeitos negativos para o rendimento de vitamina E, ou seja, ao passar do seu nível mínimo para o máximo a sua concentração tende a diminuir. As variáveis que apresentaram maior decréscimo de concentração foram a temperatura (-0,89) e o flush (-0,50).

Porém, quando calculado os efeitos entre a interação de duas variáveis a maioria desses resultados levam a um acréscimo de vitamina E. A variável massa em relação ao flush resulta em um aumento de 0,41 (mg/100g), assim como a variável tempo em relação ao flush que acresce 0,37 (mg 100g⁻¹) de vitamina E no óleo, enquanto que a combinação entre tempo e ciclos promove um decréscimo de 0,46 (mg 100g⁻¹) desta vitamina.

Quando analisado os resultados obtidos com os extratos de hexano:DCM verifica-se que o número de variáveis significativas com efeito positivo reduziu em relação as variáveis encontradas nas amostras extraídas com hexano. Porém a média apresentada por esse conjunto de experimentos (1,88 mg/100g) foi próximo da média dos experimentos com hexano.

As concentrações de vitamina E nas amostras variam de 0,4 a aproximadamente 3 (mg/100g) no óleo extraído. Porém ao realizar uma média entre os resultados de todos os experimentos obtém-se uma concentração em torno de 2 % de vitamina E no óleo de semente de uva.

As amostras 1 (1 g,10 min, 1ciclo, 25°C,150 %), 4 (3 g, 30 min, 1 ciclo, 25°C, 150 %), 8 (3 g, 30 min, 3 ciclos, 25°C, 30% flush) e 14 (3 g, 10 min, 3 ciclos, 100°C e 30 %) apresentaram as maiores concentrações de vitamina E experimentalmente obtidas na extração do óleo de semente de uva. Porém quando analisado os resultados sugeridos pelo modelo verifica-se que o experimento 14 não está adequado ao modelo proposto.

Os primeiros 8 experimentos possuem temperatura de 25°C, tendo em vista que a concentração da vitamina E não é prejudicada nesta temperatura de extração, e

as demais variáveis de extração não apresentam efeitos significativos para a alteração na extração de todo o analito da amostra, obtém-se concentrações mais altas.

As amostras 11 e 13 apresentaram as menores concentrações de vitamina E segundo os dados experimentais. Porém segundo os dados teóricos, além destas amostras, os experimentos 10 e 16 possuem concentrações semelhantes. De modo geral pode-se estabelecer que as amostras extraídas a 100°C possuíram um menor rendimento na extração de vitamina E no óleo de semente de uva extraído com a solução de hexano:DCM.

c) análise dos óleos extraídos por PLE com diclorometano

Ao avaliar esse conjunto de amostra, extraídas com DCM, pode-se verificar que a variável temperatura (0,12) não é mais um fator que age negativamente na amostra, porém o efeito gerado é de baixa intensidade, provavelmente isso é decorrente a alta volatilidade deste solvente, com ponto de ebulição próximo a 40°C, em pressão ambiente, o que provoca uma maior difusibilidade na amostra.

Por outro lado, o tempo de extração é o fator mais representativo, sendo que quando aumentamos de 10 para 30 minutos tende-se a diminuir 1 (mg/100g) de vitamina E, no óleo extraído.

Os experimentos com DCM apresentaram concentrações de média inferior ao encontrado com hexano e com hexano/DCM. As amostras continuam com a mesma faixa de concentração, ficando entre 0,6 à 3 % de concentração. A amostra 14 (3 g, 10 min, 3 ciclos, 100°C e 30 % de flush) obteve a maior concentração (3 mg/100g) de vitamina E dentro do conjunto de experimentos extraídos com DCM. As menores concentrações foram obtidas com os experimentos 4 e 11.

As interações entre massa/temperatura se mostram importantes para o aumento da concentração de vitamina E no óleo de semente de uva (0,51). Por outro lado a interação tempo/temperatura apresentou efeitos prejudiciais, causando um decréscimo de 0,46, esse fato leva a crer que em 30 minutos de extração a 100°C pode estar havendo a degradação da vitamina E extraída.

d) análise dos óleos extraídos por PLE com acetato de etila

A média das concentrações, obtidas para as amostras extraídas com acetato de etila (1,61), é inferior aos demais planejamentos experimentais. Sabendo que as moléculas de vitamina E são lipofílicas e encontram-se entre cadeias de ácidos graxos, sugere-se que a polaridade do solvente influencia negativamente no enriquecimento de vitamina E. Por outro lado também foram obtidos os menores resultados de extração de óleo de semente de uva com este solvente.

A variável de número de ciclos foi a que mais contribuiu para um aumento de vitamina E no óleo de semente de uva (0,86 mg/100g). Quando analisado as interações entre duas variáveis a massa contribuiu significativamente quando interage com o tempo (0,82 mg/100g), ou seja, é necessário maior tempo de extração quando se trabalha com 3 gramas de amostra.

As variáveis massa (0,44 mg/100g) e tempo (0,54 mg/100g) apresentaram efeitos significativos, porém sua contribuição foi relacionado a diminuição da concentração de vitamina E, quando os fatores passam do nível menor para o maior. O efeito negativo da variável massa é esperado, quando se verifica que o acetato de etila é um solvente que não promove boa solubilidade deste analito.

O experimento 13 (1g, 10 min, 3 ciclos, 100°C, 150 %) apresentou a maior concentração de vitamina E (3,5 mg/100g), enquanto que a amostra com menor concentração foi de 0,3 mg/100g (experimento 11), esses resultados seguiram as mesmas características que o conjunto de amostras extraídas com DCM.

A interação entre o número de ciclos e o flush mostrou ser significativa para o modelo proposto. A concentração de vitamina E possui a tendência de aumentar 1 mg/100g se passarmos de 1 para 3 o números de ciclos enquanto o volume de solvente empregado para a extração também é aumentado.

Todas as interações desse conjunto de amostra sugere que o solvente acetato de etila não é um bom solvente extrator para a vitamina E e por isso há necessidade de

se implementar o tempo de extração, aumentar o volume de solvente e o número de ciclos, concomitantemente.

4.2.4.2.3.1 ANÁLISE DOS RESÍDUOS

Para melhor avaliar a contribuição de cada variável foi necessário construir um modelo simplificado onde as variáveis que não são significativas (abaixo de 95% de confiança) são retiradas dos modelos para as análises de cada solvente extrator. As **Equações 9, 10, 11 e 12** representam os modelos utilizados para o resultado das concentrações de vitamina E nas amostras extraídas com hexano, solução de hexano:DCM, DCM e acetato de etila, respectivamente.

$$\% \text{ Vitamina E} = 1,82 + (-0,20)X_1 + 0,33X_2 + 0,16X_4 + (-0,41)X_5 + (-0,25)X_1X_2 + 0,24X_1X_3 + 0,23X_1X_4 + 0,15X_3X_4 + 0,26X_4X_5 \quad (\text{Equação 9})$$

$$\% \text{ Vitamina E} = 1,88 + (-0,89)X_4 \quad (\text{Equação 10})$$

$$\% \text{ Vitamina E} = 1,60 + (-0,22)X_1 + (-1,00)X_2 + (-0,11)X_3 + (0,12)X_4 + (-0,28)X_5 + (0,33)X_1X_3 + (0,51)X_1X_4 + (0,18)X_2X_3 + (-0,46)X_2X_4 + (-0,30)X_4X_5 \quad (\text{Equação 11})$$

$$\% \text{ Vitamina E} = 1,61 + (-0,44)X_1 + (-0,54)X_2 + (0,86)X_3 + (0,38)X_5 + (0,82)X_1X_2 + (0,22)X_1X_4 + (0,42)X_2X_3 + (-0,28)X_2X_4 + (0,30)X_2X_5 + (1,01)X_3X_5 \quad (\text{Equação 12})$$

O coeficiente de correlação dado pelo modelo experimental simplificado do hexano foi 0,9633 que indica uma boa relação entre valores observados e previstos pelo modelo. A **Figura 43**, apresenta os resíduos da comparação entre o resultado experimental e o modelo teórico nos diferentes solventes empregados na extração..

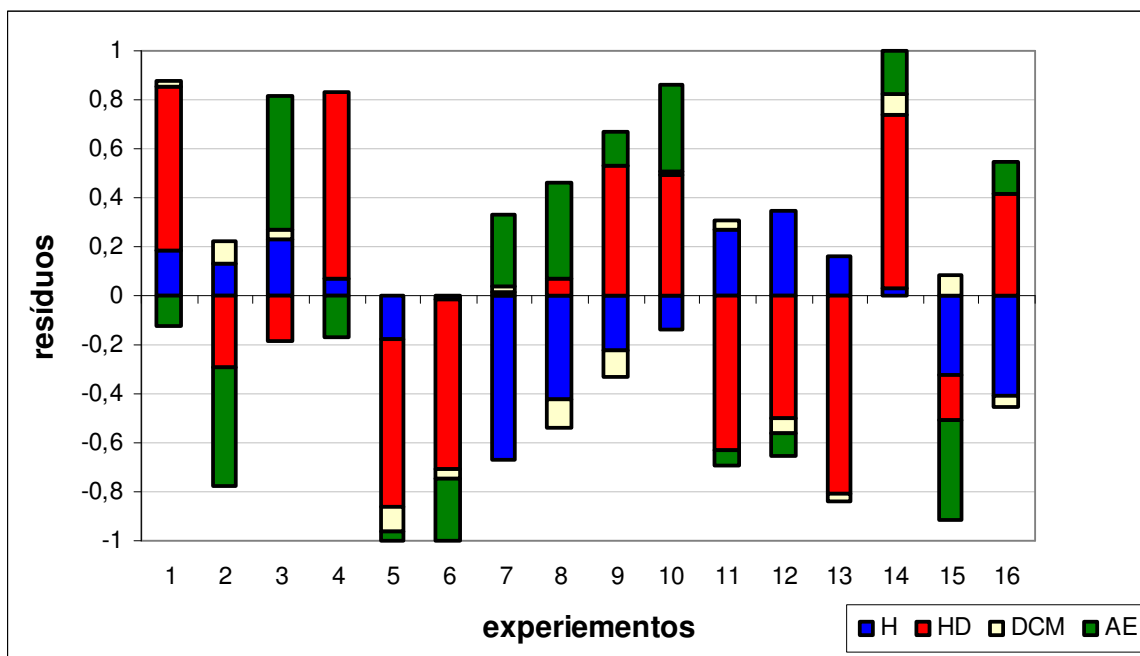


Figura 43: Comparação entre as concentrações de vitamina E obtida nas extrações com hexano, hexano:DCM, DCM e acetato de etila em PLE e o valores propostos pelo modelo do planejamento semi-fatorial.

As maiores variações entre o modelo e os resultados, dos experimentos com hexano, foram dadas pelas amostras 11, 12 e 16, experimentos esses realizados com o mesmo tempo e temperatura de extração. Enquanto que as amostras 4, 6 e 14 apresentaram um resíduo mínimo próximo a zero, ou seja, valores muito próximos ao experimental.

Nas extrações com hexano:DCM a análise dos dados e a discriminação das variáveis significativas verificou-se que a única variável relevante para esse conjunto de experimentos foi a temperatura. Porém quando se altera a temperatura de 25°C para 100°C a amostra tende a diminuir a concentração de vitamina E em 0,89 mg 100g⁻¹.

Quando é analisado o resíduo obtido através do modelo proposto é visível a grande diferença entre o valor teórico e o experimental, mostra que o grau de ajuste do modelo proposto não foi adequado.

O modelo geral que representa as extrações com DCM apresentou uma proporção de variância próxima a 1, ou seja, o modelo proposto para a concentração dos resultados com este solvente é muito próximo ao comparado com o valor

experimental obtido. O coeficiente correlação está próximo a 1 indicando que o resíduo obtido nesse modelo é muito pequeno.

O modelo simplificado, proposto para os experimentos com acetato de etila, apresentou um coeficiente de variação 0,9748, indicando que o modelo tem uma ótima correlação com os dados experimentais. A **Figura 43** apresenta o resíduo entre o valor teórico, obtido com o modelo, e o valor experimental das amostras. Dentre estes resultados as amostras 2, 3 e 15 foram as que menos se adequaram ao modelo.

4.2.4.2.4 ANÁLISE DE VITAMINA E NOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA EXTRAÍDOS COM FLUÍDO SUPERCRÍTICO

A amostra de semente de uva Isabel/Herbemont foi extraída por fluido supercrítico em diferentes condições experimentais, como descrito no capítulo experimental, **página 47**. Algumas amostras extraídas com CO₂ como fluido supercrítico foram analisadas quanto ao teor de vitamina E e comparadas com amostras extraídas com propano.

Através dos resultados obtidos (**Figura 44**) foi encontrado a maior concentração de vitamina E, no experimento que utilizou CO₂ como fluido supercrítico sob temperatura de 45°C e pressão de 181 bar. Neste experimento utilizou-se densidade de 1,7 para a extração, porém com a menor temperatura e pressão que os demais experimentos. Em consequência aos resultados apresentados sugere-se que os experimentos com temperatura e pressão mais altas não são responsáveis por um aumento de concentração de vitamina E.

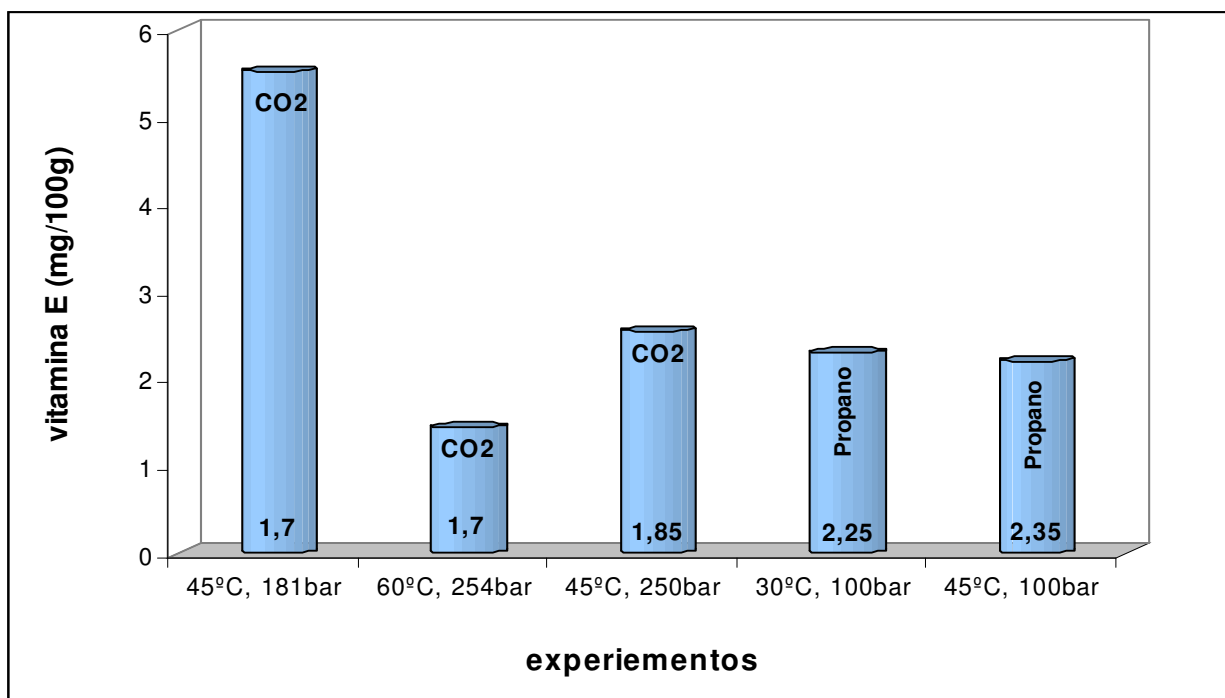


Figura 44:Quantificação de vitamina E em óleo de semente de uva, extraídas por SFE com CO₂ e propano. Condições de análise descrita na **Seção 3.5.4, pág 53**.

A concentração de vitamina E, em amostras extraídas com propano foi semelhante quando extraída com 30°C e 45°C, pois utilizam condições semelhantes de extração (pressão, temperatura e densidade reduzida). Quando comparadas com os experimentos extraídos por SFE com CO₂ apresentaram a mesma concentração que amostra extraída a 45°C e 250 bar. Entre os dois solventes utilizados (CO₂ e propano) o CO₂ conseguiu concentrações maiores de vitamina E, porém foram necessários condições mais drásticas e um tempo de 220 minutos para a extração da amostra.

As amostras extraídas com 10 % de solventes modificadores, de diferentes polaridades, foram analisadas e seus resultados estão representados na **Figura 45**.

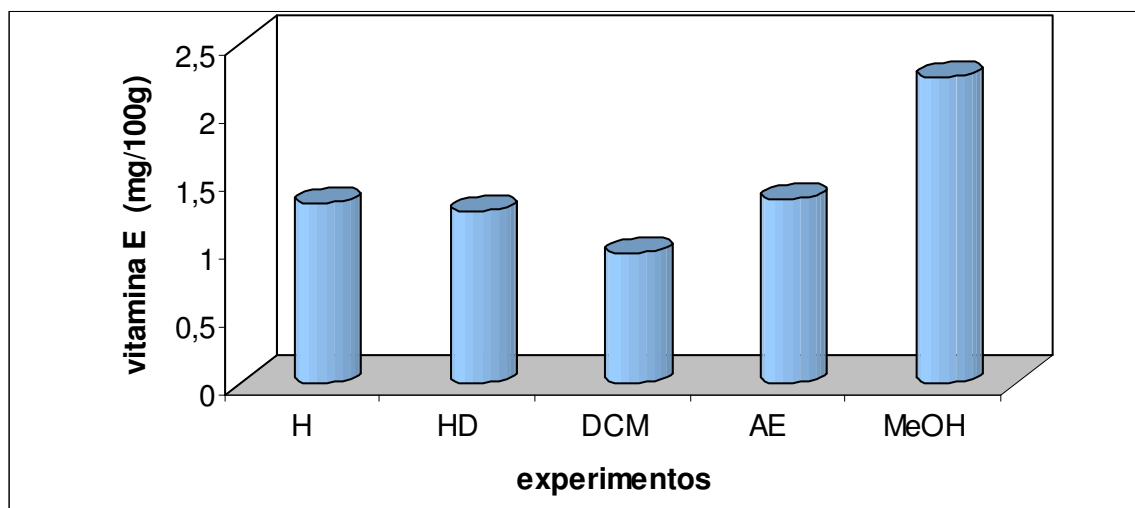


Figura 45: Quantificação de vitamina E em óleo de semente de uva, extraído por SFE em CO₂ com adição 10% de solvente modificador a 45 °C e 181 bar; **H: hexano, HD: solução hexano/DCM (1:1); DCM: diclorometano, AE: acetato de etila e MeOH: metanol.

Condições de análise descrita na **Seção 3.5.4, pág 53**.

Quando analisadas as amostras extraídas com solventes modificadores pode-se observar que a concentração de vitamina E em óleo extraídos com hexano, Hexano/DCM, DCM e acetato de etila demonstraram ter concentrações idênticas, aproximadamente 1,5 (mg/100g). Já a amostra extraída com metanol apresentou concentração em torno de 2,5 (mg/100g) superior até mesmo a amostra extraída com etanol nas mesmas condições experimentais.

Amostras extraídas com CO₂ e etanol como solvente modificador, também foram analisadas quanto ao teor de vitamina E. A **Figura 46** apresenta graficamente os resultados das amostras extraídas com etanol.

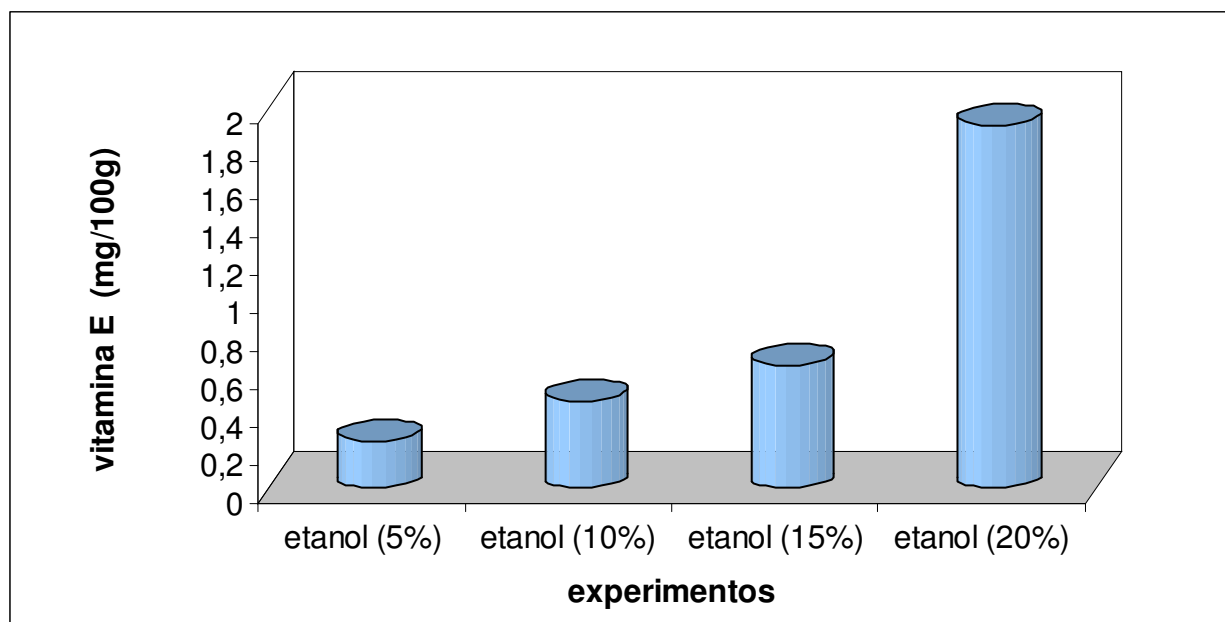


Figura 46: Quantificação de vitamina E em óleo de semente de uva, expressos em porcentagem, extraídas por SFE em CO₂ com adição de etanol como solvente modificador a 45 °C e 181 bar.

Condições de análise descrita na **Seção 3.5.4, pág 53**.

Observando a **Figura 46** verifica-se que quanto maior a concentração de etanol como solvente modificador, maior é a concentração de vitamina E na amostra.

Embora tenha sido possível realizar a extração de vitamina E em amostra extraídas com etanol, é possível dizer que o CO₂ atua melhor para a extração desse analito, visto que a amostra extraída nas mesmas condições de temperatura e pressão utilizando somente CO₂ apresentou melhores resultados.

A fim de comparar os resultados obtidos com amostras extraídas em CO₂ como fluído supercrítico são apresentados na **Figura 47** os melhores resultados com e sem solvente modificador.

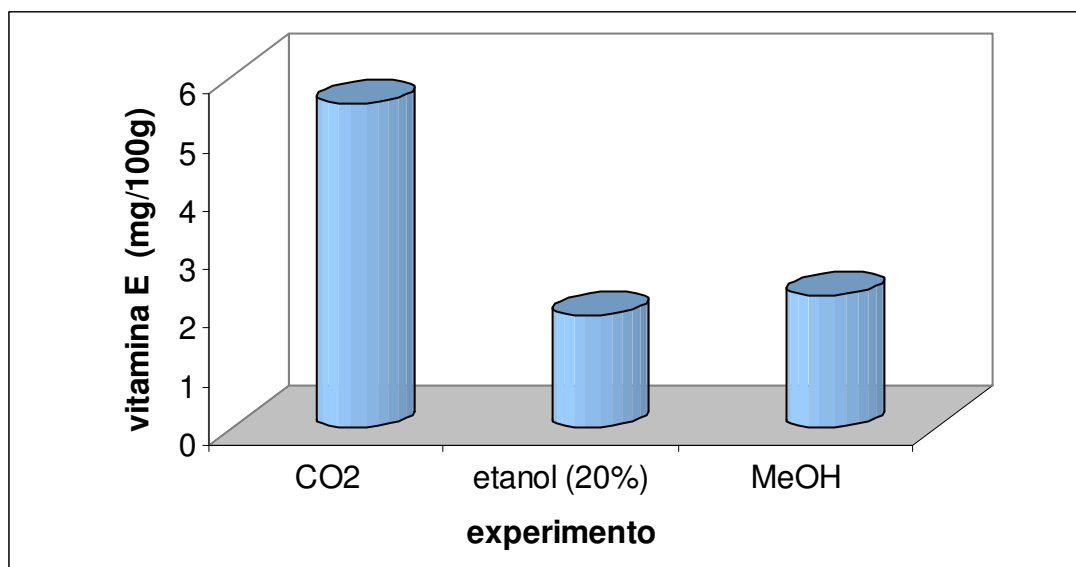


Figura 47: Comparação dos melhores resultados para a quantificação de vitamina E em amostras extraídas com CO₂
Condições de análise descrita na **Seção 3.5.4, pág 53.**

Através da **Figura 53** é confirmado que não há necessidade de adição de solventes modificadores ao CO₂ para que se consiga extrair o óleo de semente de uva com vitamina E. A extração com CO₂ sem adição de solventes modificadores foi a que apresentou melhor resultado, provavelmente pela condição de ser um solvente apolar, que favorece a solubilidade deste analito, já que ele se encontra em meio de triacilgliceróis,.

4.2.4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE VITAMINA E NOS ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA

Para discutir o resultado obtido das análises de vitamina E, em diferentes métodos de extração, foi realizada a comparação gráfica dos melhores resultados obtidos para óleos de semente de uva Isabel/Herbemont. Os resultados estão apresentados na **Figura 48.**

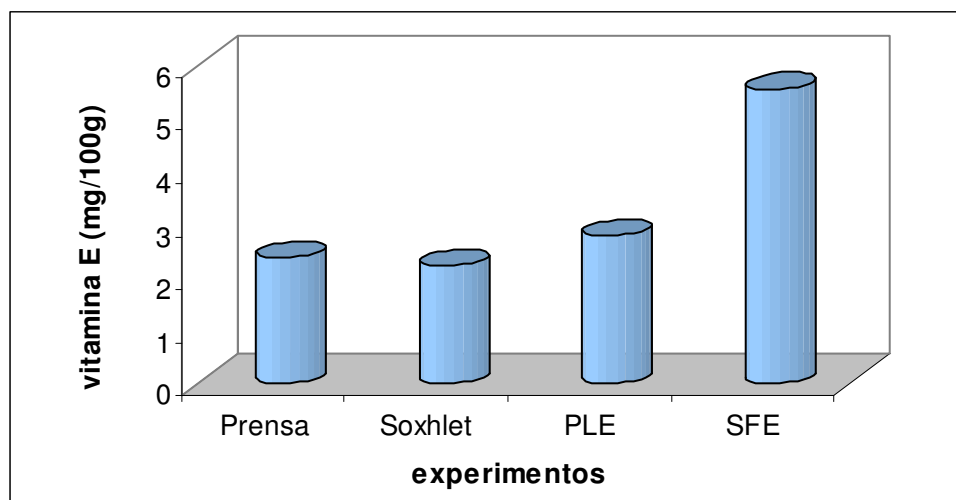


Figura 48: Comparação dos melhores resultados para a quantificação de vitamina E em amostras extraídas com diferentes métodos de extração.

Condições de análise descrita na Seção 3.6.3.3, pág 55.

Verifica-se que as amostras extraídas por prensagem após 72 h apresentaram concentrações semelhantes a amostra extraída por 20 horas em Soxhlet com hexano, 2,4 % e 2,2 %, respectivamente. Já em amostras extraídas por PLE a maior concentração foi de 3,3 % de vitamina quando extraída em acetato de etila por 3 ciclos de 30 minutos a 100°C e 150 % de flush. Contudo a extração com fluído supercrítico, utilizando CO₂ como solvente, mostrou ter uma capacidade maior em extrair óleo de semente de uva enriquecido com vitamina E.

4.3 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DOS ÓLEOS EXTRAÍDOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE SEMENTES DE UVA

O estudo das diferentes variedades de sementes de uva foi realizado para os seguintes tipos de uva: (1) mistura de Herbemont/Isabel (HI), (2) mistura de Seibel/Isabel (SI), (3) Isabel (ISA), (4) Moscatel (MO), (5) Cabernet (CA) e (6) Merlot (ME). Os métodos de extração usados para comparação foram Prensagem, Soxhlet e PLE, na sua condição ótima, experimento 16, **Seção 3.4.2.2, página 42** (3 g de sementes, 3 ciclos de 30 minutos de extração a 100°C e com um flush de 150 % em volume de solvente - hexano).

4.3.1 ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS (AGT)

Os resultados em termos de composição de ácidos graxos totais para os óleos extraídos por prensagem e Soxhlet e PLE com sementes de diferentes variedades de uvas estão apresentados na **Tabela XLVI**.

Os resultados em PLE foram obtidos apenas para as espécies de uva HI, ISA, MO, CA. Por problemas operacionais, as amostras SI e ME não foram analisadas nesta etapa do trabalho.

Os resultados encontrados para os 4 ácidos majoritários (palmítico, linoléico, oléico e esteárico) estão também representados na **Figura 49**.

Comparando-se estes dados com a **Tabela XXXI (página 88)**, percebe-se que os resultados obtidos para os óleos comerciais são semelhantes ao resultado obtido com o óleo de semente de uva Isabel e apresentaram menores teores de ácidos graxos insaturados que os demais óleos extraídos nesse trabalho. Grandes concentrações de ácidos graxos insaturados, essenciais para a saúde humana, estão presentes em todas as variedades de sementes de uva estudadas.

Tabela XLVI: Quantificação de ácidos graxos totais em óleo de semente de uva extraído por prensagem, Soxhlet e PLE, expressos em porcentagem de massa e comparação com dados da ANVISA

| Ácidos | prensagem | | | | | | | Soxhlet | | | | | | PLE (HEXANO) | | | | ANVISA |
|--------------------|-----------|------|------|------|------|------|------|---------|------|------|------|------|------|--------------|------|------|----------|--------|
| | HI | SI | ISA | MO | CA | ME | HI | SI | ISA | MO | CA | ME | HI | ISA | MO | CA | | |
| C12:0 Láurico | 0,01 | 0,20 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | ND | 0,01 | <0,5 | |
| C14:0 Mirístico | 0,03 | 0,23 | 0,05 | 0,04 | 0,04 | 0,02 | 0,04 | 0,03 | 0,07 | 0,09 | 0,07 | 0,03 | 0,02 | 0,05 | 0,04 | 0,05 | <0,3 | |
| C16:1 Palmitoleico | 0,18 | ND | 0,21 | 0,20 | 0,12 | 0,07 | 0,19 | 0,21 | 0,33 | 0,20 | 0,22 | 0,09 | 0,14 | 0,25 | 0,15 | 0,13 | <1,2 | |
| C16:0 Palmítico | 7,82 | 5,83 | 8,35 | 8,82 | 7,79 | 6,82 | 7,99 | 7,99 | 9,43 | 8,95 | 9,51 | 7,25 | 6,79 | 10,6 | 8,38 | 8,83 | 5,5 - 11 | |
| C18:2 Linoléico | 66,4 | 71,8 | 65,5 | 66,1 | 68,1 | 71,7 | 68,2 | 65,9 | 62,2 | 68,0 | 64,3 | 71,2 | 68,7 | 64,4 | 70,5 | 67,3 | 58 - 78 | |
| C18:1 Oléico | 20,8 | 16,6 | 20,9 | 19,2 | 17,9 | 16,7 | 18,8 | 21,0 | 22,8 | 17,9 | 19,6 | 16,9 | 20,5 | 18,1 | 16,7 | 17,8 | 12 - 28 | |
| C18:0 Esteárico | 4,52 | 3,62 | 4,73 | 5,40 | 5,72 | 4,44 | 4,51 | 4,60 | 4,82 | 4,74 | 5,92 | 4,35 | 3,65 | 6,24 | 3,97 | 5,54 | 3 - 6 | |
| C20:0 Araquídico | 0,12 | 0,51 | 0,13 | 0,17 | 0,16 | 0,12 | 0,12 | 0,14 | 0,14 | 0,18 | 0,20 | 0,12 | 0,07 | 0,15 | 0,11 | 0,17 | <1 | |
| C24:0 Lignocérico | 0,01 | 0,48 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,05 | 0,03 | 0,04 | 0,05 | 0,03 | 0,01 | 0,01 | 0,03 | 0,01 | 0,02 | <0,1 | |

NA: Não analisado

ND: não detectado

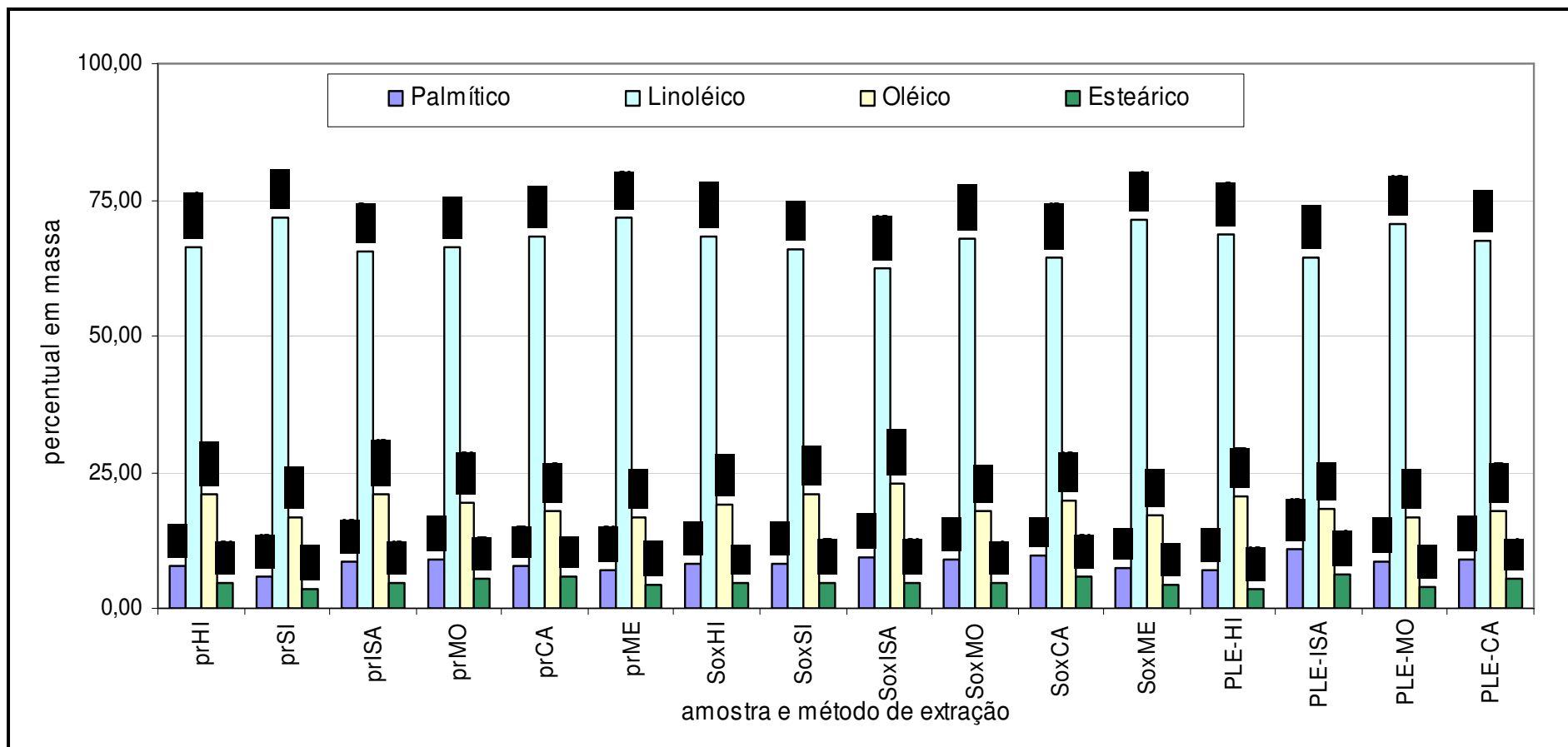


Figura 49: Variação da concentração dos ácidos palmítico, linoléico, oléico e esteárico em óleos de diferentes variedades de semente de uva, extraídos por prensagem, Soxhlet e PLE.

Os óleos apresentaram uma variação de concentração mássica (expressa em %) para o ácido palmítico de $8,20 \pm 1,20$, ácido linoléico de $67,57 \pm 2,81$, para oléico $18,94 \pm 1,89$ e ácido esteárico de $4,80 \pm 0,78$. Portanto, levando-se em consideração o desvio de cada medida, os resultados foram muito semelhantes para os três métodos de extração. Os demais ácidos graxos não apresentaram concentração superior a 0,5 % de cada ácido graxo em separado, estando esses resultados de acordo com os descritos na literatura.

As análises de ácidos graxos totais dos óleos de sementes de uvas das variedades híbridas e das *Vitis viníferas* mostraram aproximadamente a mesma composição qualitativa e concentrações semelhantes de ácidos graxos. O óleo proveniente da variedade Isabel/Seibel, extraído por prensagem foi o que apresentou a maior concentração de ácido linoléico (71,86 %), enquanto que o óleo extraído por Soxhlet das sementes de uva da variedade Isabel apresentou a menor concentração deste ácido (62,25 %). A maior concentração dos ácidos palmítico e esteárico, ocorreu na extração por PLE com sementes de uva da variedade Isabel, (10,68 % e 6,24 %, respectivamente), enquanto os menores teores destes ácidos ocorreram na mistura Seibel/Isabel, extraídas por prensagem (5,83 % e 3,62 %), respectivamente. O ácido oléico apresentou maior concentração no óleo obtido por Soxhlet das uvas da variedade Isabel e menor concentração no óleo de prensagem da mistura Seibel/Isabel (22,89 % e 16,62 %), respectivamente.

A relação de oléico/linoléico, que avalia a tendência auto-oxidativa do óleo, variou entre 0,23% (prensagem das sementes de uva Merlot e da mistura de sementes de uva Seibel/Isabel) e 0,37% (extração por Soxhlet das sementes de uva Isabel). Pode-se colocar em ordem crescente de autooxidação os óleos extraídos com as sementes de uva: Seibel/Isabel < Merlot < Moscatel < Herbemont/Isabel < Cabernet < Isabel.

4.3.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS NÃO LIGADOS AO GLICEROL: FRAÇÃO INSAPONIFICÁVEL

4.3.2.1 ANÁLISE QUALITATIVA DA FRAÇÃO INSAPONIFICÁVEL

4.3.2.1.1 EXTRAÇÕES CLÁSSICAS: PRENSAGEM E SOXHLET

As amostras extraídas com prensagem possuem poucos interferentes externos como solventes e temperatura, diferente do processo de extração com Soxhlet que faz uso destes recursos para obter um maior rendimento. A variabilidade dos compostos encontrados nesses extratos, provavelmente, deve ser conseqüência da interferência do solvente e da temperatura empregada na extração por Soxhlet. Os cromatogramas obtidos para as diferentes amostras se apresentaram muito semelhantes, por esta razão os resultados são apresentados na forma de tabela (**Tabela XLVII**).

A **Tabela XLVII** indica a presença de ácidos graxos livres tanto na amostra de prensagem como de Soxhlet demonstrando que existe a necessidade de um posterior refinamento do óleo para ser comercializado. Também se constatou que além dos ácidos, os ésteres etílicos fazem parte da maioria dos compostos presentes nessas amostras, entre os compostos minoritários estão os fitosteróis, monoglicerídeos e alguns ácidos graxos minoritários.

Quando são comparados os dados da literatura [13] sobre ácidos graxos no óleo de semente de uva com os compostos descritos na **Tabela XLVII**, verificamos que nas amostras extraídas em laboratório há presença de ácidos como o caprílico e o pelargônico que não são citados ao longo do estudo da literatura. Esses compostos estão presentes principalmente nas extrações com Soxhlet, sendo provavelmente a compostos provenientes da quebra de ligações de ácidos graxos com cadeias carbônicas maiores. A presença do glicerol é marcante também nestas amostras confirmando os indícios da quebra de ligação.

O ácido fosfórico sililado com BSTFA, é encontrado como composto proveniente de moléculas de fosfatídeos, livres ou que se quebraram ao longo do processo de extração.

Tabela XLVII: Compostos identificados na caracterização dos óleos de diferentes variedades de semente de uva em extrações clássicas: prensagem e Soxhlet.

| pico | fórmula | nome | prensagem (#) | | | | | | Soxhlet (#) | | | | | |
|------|--|------------------------|---------------|----|-----|----|----|----|-------------|----|-----|----|----|----|
| | | | HI | SI | ISA | MO | CA | ME | HI | SI | ISA | MO | CA | ME |
| 1 | C ₁₀ H ₁₆ O | decadienal | | | | X | X | | X | X | X | X | X | X |
| 2 | C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | caprilato de etila | X | X | | | X | X | | | | | | X |
| 3 | C ₁₀ H ₁₄ O ₂ Si | ácido benzóico (*) | | | | | | | X | | | | X | |
| 4 | C ₁₁ H ₁₈ OSi | feniletanol (*) | | | | | | | | X | X | X | | X |
| 5 | C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si | ácido caprílico (*) | X | | | X | X | X | X | X | X | X | X | |
| 6 | C ₉ H ₂₇ O ₄ PSi | ácido fosfórico (*) | X | | | | | | X | | | X | | |
| 7 | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | caprato de etila | X | | | | | | | X | X | | X | X |
| 8 | C ₁₂ H ₂₆ O ₂ Si | ácido pelargônico (*) | | | | | | | X | X | X | X | | |
| 9 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃ | glicerol (*) | | | | | | | | X | X | | X | X |
| 10 | C ₁₃ H ₂₈ O ₂ Si | ácido capríco (*) | X | X | | | X | X | X | X | X | | X | X |
| 11 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | laurato de etila | X | X | | | X | X | | | X | | X | X |
| 12 | C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si | ácido laúrico (*) | X | | | | X | X | X | X | X | | X | X |
| 13 | C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si | ácido mirístico (*) | X | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 14 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | palmitato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 15 | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ Si | ácido palmitoleico (*) | X | | | | | X | X | X | X | X | X | X |
| 16 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | ácido palmítico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 17 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | linoleato de metila | X | | | X | | X | X | X | | X | X | X |
| 18 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | oleato de metila | | | | X | | X | X | X | | X | X | X |
| 19 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | linoleato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 20 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | oleato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 21 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | estearato de etila | X | | | | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 22 | C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si | ácido linoléico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 23 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si | ácido oléico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 24 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si | ácido esteárico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 25 | C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | monopalmitina | | | | | | | | | | X | X | |
| 26 | C ₂₇ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | monolinoleina | X | | | X | X | X | | X | | X | X | X |
| 27 | C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂ | monooleina | X | | | X | X | X | | X | | X | X | X |
| 28 | C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si ₂ | monoestearina | X | | | X | | | | | | X | X | |
| 29 | C ₃₀ H ₅₀ | escaleno | X | X | X | X | X | | X | X | | | | X |
| 30 | C ₂₈ H ₄₈ O | ergostenol | X | X | | X | X | | X | X | | X | X | X |
| 31 | C ₂₉ H ₅₀ O | estigmastenol | X | X | | X | X | | X | X | X | X | X | X |
| 32 | C ₃₂ H ₅₆ OSi | estigmasterol (*) | X | X | | X | X | | X | X | X | X | X | X |

(*) detectado como derivado sililado (TMS).

4.3.2.1.2 EXTRAÇÃO COM LIQUIDO PRESSURIZADO (PLE)

O processo de extração por PLE foi realizado com as mesmas espécies de sementes de uva usado no processo de prensagem e Soxhlet.

A **Figura 50** apresenta os cromatogramas referentes às extrações das sementes de diferentes variedades de uvas em hexano utilizando o método PLE nas condições otimizadas (3 gramas de amostra, 3 ciclos, 30 minutos cada ciclo e 150 % de flush). Os compostos encontrados estão identificados na **Tabela XLVIII**.

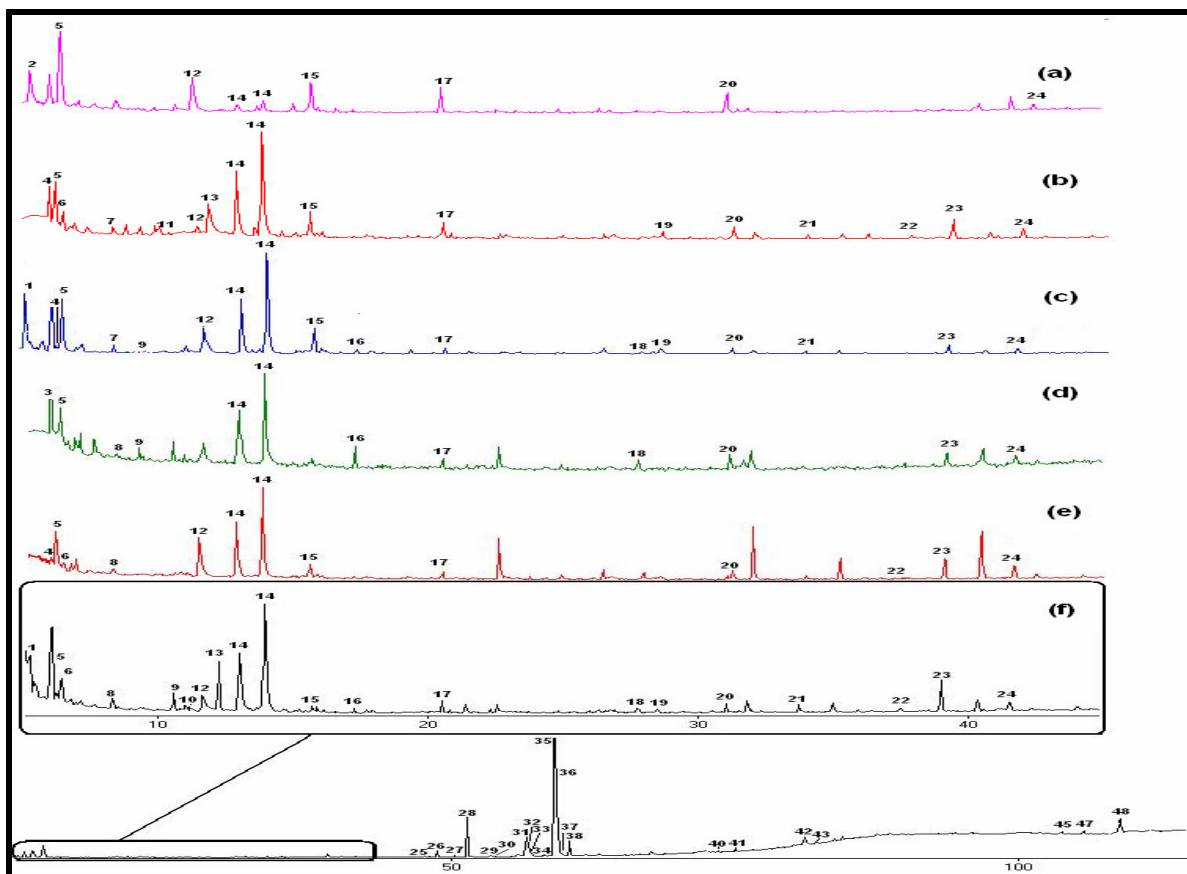


Figura 50: Cromatogramas do Íon Total para os óleos obtidos por PLE com hexano, das diferentes variedades de sementes da uva e cromatogramas expandido da região de 6 à 45 minutos dos óleos (a) Herbemont/Isabel, (b) Seibel/Isabel, (c) Isabel, (d) Merlot, (e) Moscatel e (f) Cabernet, derivatizadas com BSTFA

Condições cromatográficas: citadas no texto (Seção 3.5.2, página 51) e identificação dos picos de acordo com a Tabela XLVIII.

Tabela XLVIII: Compostos identificados nos extratos hexânicos das diferentes variedades de uvas usando PLE

| N° | formula | nome | Sementes de Uvas | | | | | |
|----|--|------------------------|------------------|----|-----|----|----|----|
| | | | HI | SI | ISA | ME | MO | CA |
| 1 | C ₇ H ₁₂ O | heptenal | X | | X | | | |
| 2 | C ₉ H ₁₆ O | ciclo nonanone | X | | | | | |
| 3 | C ₉ H ₁₈ O | nonanal | | | | X | X | |
| 4 | C ₁₀ H ₁₈ O | decenal | | X | X | | X | |
| 5 | C ₉ H ₂₀ O ₂ Si | ácido caproico (*) | X | X | X | X | X | X |
| 6 | C ₉ H ₂₂ O ₃ Si ₂ | ácido láctico (*) | | X | | | X | |
| 7 | C ₁₀ H ₂₂ O ₂ Si | ácido heptanoico | | X | X | | | |
| 8 | C ₁₁ H ₁₈ O _{Si} | fenil etanol (*) | | | | X | | X |
| 9 | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | caprato de etila | | | X | X | | X |
| 10 | C ₉ H ₁₈ O ₄ Si ₂ | succinato de etila | | | | | | X |
| 11 | C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂ | ácido succínico | | X | | | | |
| 12 | C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si | ácido caprílico (*) | X | X | X | | X | X |
| 13 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃ | glicerol (*) | | X | | | | X |
| 14 | C ₁₀ H ₁₆ O | decadienal | X | X | X | X | X | X |
| 15 | C ₁₂ H ₂₆ O ₂ Si | ácido pelargônico (*) | X | X | X | | X | X |
| 16 | C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | caprilato de etila | | | X | X | | |
| 17 | C ₁₃ H ₂₈ O ₂ Si | ácido capríco (*) | X | X | X | X | X | X |
| 18 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | laurato de etila | | | X | X | | X |
| 19 | C ₁₀ H ₂₀ O ₄ Si ₂ | ácido fumarico (*) | | X | X | | | X |
| 20 | C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si | ácido láurico (*) | X | X | X | X | X | X |
| 21 | C ₁₄ H ₃₀ O ₄ Si | ácido subérico (*) | | X | X | | | X |
| 22 | C ₁₄ H ₂₄ O ₄ Si ₂ | ácido vanilínico (*) | | X | | | X | X |
| 23 | C ₁₅ H ₃₂ O ₄ Si | ácido azelaico (*) | | X | X | X | X | X |
| 24 | C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si | ácido mirístico (*) | X | X | X | X | X | X |
| 25 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | palmitato de metila | X | T | X | X | T | X |
| 26 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | palmitato de etila | X | X | X | X | X | X |
| 27 | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ Si | ácido palmitoleico (*) | | X | X | X | X | X |
| 28 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | ácido palmítico (*) | X | X | X | X | X | X |
| 29 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | linolenato de metila | X | X | X | X | X | X |
| 30 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | oleato de metila | T | X | X | T | X | X |
| 31 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | linoleato etila | X | X | X | X | X | X |
| 32 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | oleato etila | X | X | X | X | X | X |
| 33 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | linolenato etila | X | T | T | X | T | X |
| 34 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | estearato etila | X | X | X | X | X | X |
| 35 | C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si | ácido linoléico (*) | X | X | X | X | X | X |
| 36 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ Si | ácido oléico (*) | X | X | X | X | X | X |
| 37 | C ₂₁ H ₃₈ O ₂ Si | ácido linolênico (*) | | X | X | X | X | X |
| 38 | C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si | ácido esteárico (*) | | X | X | X | X | X |
| 39 | C ₂₃ H ₄₃ O _{Si} | ácido araquídico (*) | | X | | | | |
| 40 | C ₂₅ H ₅₂ O _{Si} | ácido lignocérico (*) | | X | | | | X |
| 41 | C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | monopalmitina (*) | X | X | T | | | X |
| 42 | C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂ | monolinoleína (*) | X | X | | X | X | X |

Continuação da **Tabela XLVIII** :

| N° | formula | nome | Sementes de Uvas | | | | | |
|----|--|-------------------|------------------|----|-----|----|----|----|
| | | | HI | SI | ISA | ME | MO | CA |
| 43 | C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si ₂ | monooleína (*) | X | X | | X | X | X |
| 44 | C ₃₀ H ₅₀ | escaleno | X | | | | | |
| 45 | C ₂₈ H ₄₈ O | brassicasterol | X | | | X | | X |
| 46 | C ₂₉ H ₅₀ O | clionasterol | X | X | X | X | X | |
| 47 | C ₃₁ H ₅₆ OSi | campesterol (*) | X | | | | X | X |
| 48 | C ₃₂ H ₅₆ OSi | estigmasterol (*) | | X | X | | X | X |
| 49 | C ₃₂ H ₅₈ OSi | sitosterol (*) | X | | | X | | |

(*) detectado como derivado sililado (TMS).

4.3.2.2 ANÁLISE QUANTITATIVA DA FRAÇÃO INSAPONIFICÁVEL

Após a análise qualitativa da fração de compostos insaponificáveis nas diversas amostras de óleo de semente de uva extraídas por prensagem, Soxhlet e PLE, foi determinada a concentração dos principais compostos (ácidos graxos livres, ésteres metílicos e ésteres etílicos) nestes óleos, usando o método de padronização interna (Experimental, **Seção 3.5.2**, página 51).

4.3.2.2.1 EXTRAÇÕES CLÁSSICAS: PRENSAGEM E SOXHLET

Como exemplo da análise realizada, a **Figura 51** apresenta o cromatograma expandido no modo SIM para a amostra de prensagem da semente de uva Isabel/Seibel. A **Figura 52** apresenta os resultados em termos de somatório das concentrações de ácidos graxos livres, ésteres etílicos e ésteres metílicos nas amostras de óleo de semente de uva das diferentes espécies estudadas, obtidos por prensagem e Soxhlet.

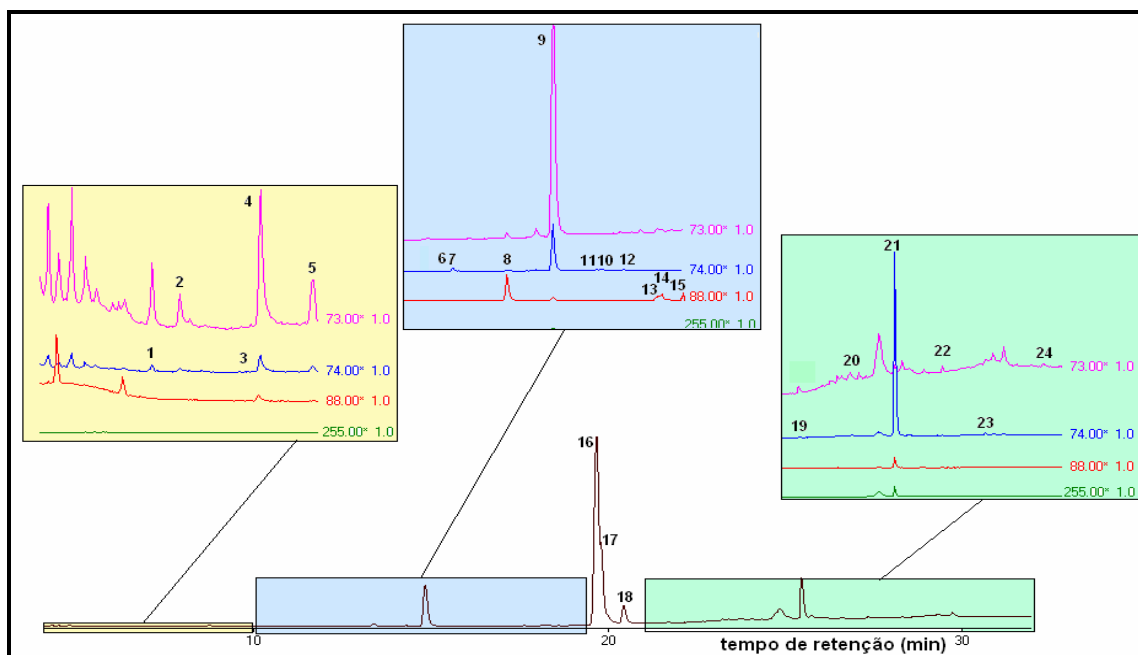


Figura 51: Cromatograma do íon monitorado (MIC) do óleo de prensagem das sementes de uva da variedade Isabel/Seibel. Condições de análise estão descritas na seção 3.6.3.2, página 51.

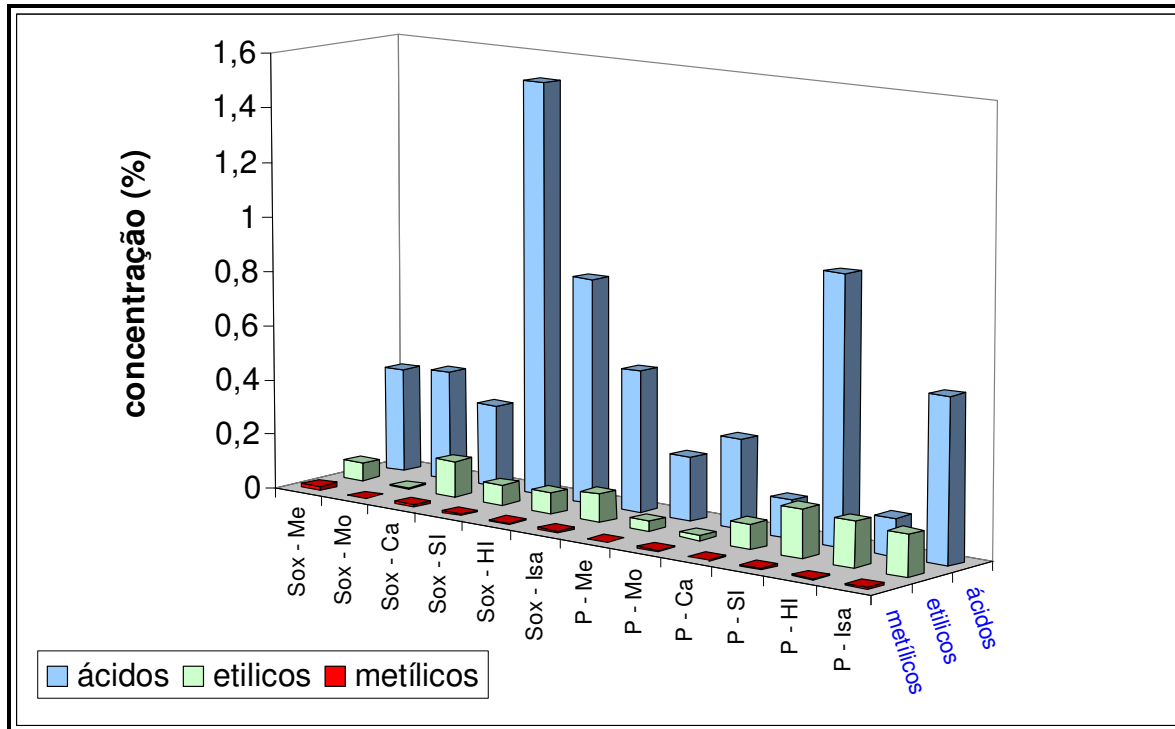


Figura 52: Análise quantitativa de compostos não ligados ao glicerol em amostras de diferentes variedades de sementes de uva extraídas por prensagem e Soxhlet.

As amostras analisadas apresentaram concentração de ésteres metílicos abaixo de 0,01%. A concentração de ésteres etílicos permaneceu entre 0,002 % e 0,2 %, sendo que, com exceção do óleo Cabernet, as amostras das variedades híbridas foram as que apresentaram maior concentração.

As variedades Isabel, Isabel/Herbemont e Isabel/Seibel forneceram o maior índice de acidez dentre os óleos analisados. Sendo que o óleo das variedades Isabel/Seibel foi o que apresentou o maior índice de acidez (0,97% para a prensagem e 1,51 % para a extração com Soxhlet).

As amostras extraídas por Soxhlet apresentaram maior concentração de ácidos graxos livres que amostras extraídas por prensagem, o que indica que o uso da temperatura favorece a formação destes compostos através da quebra de ligação entre o glicerol e o ácido graxo.

4.3.2.2 EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE)

Os resultados quantitativos para a soma de ácidos graxos livres (derivatizados com BSTFA), ésteres metílicos e etílicos nas amostras de óleos extraídos por PLE das diferentes qualidades de sementes de uva, estão apresentados na **Figura 53**.

A análise de compostos minoritários como ésteres são responsáveis por apresentar informações sobre a origem do óleo vegetal. Através da **Figura 53**, pode-se verificar que as concentrações de ésteres metílicos são semelhantes às demais amostras analisadas. Esses compostos não ultrapassam a concentração de 0,01 %.

Em seguida faz-se a análise da concentração de ésteres etílicos que apresentam concentrações entre 0,05 e 0,25 % dos compostos presentes no óleo de semente de uva. A amostra que apresentou maior concentração desses ésteres foi a amostra de óleo Cabernet (0,25 %), seguida do óleo Isabel (0,12 %) e Merlot (0,1 %).

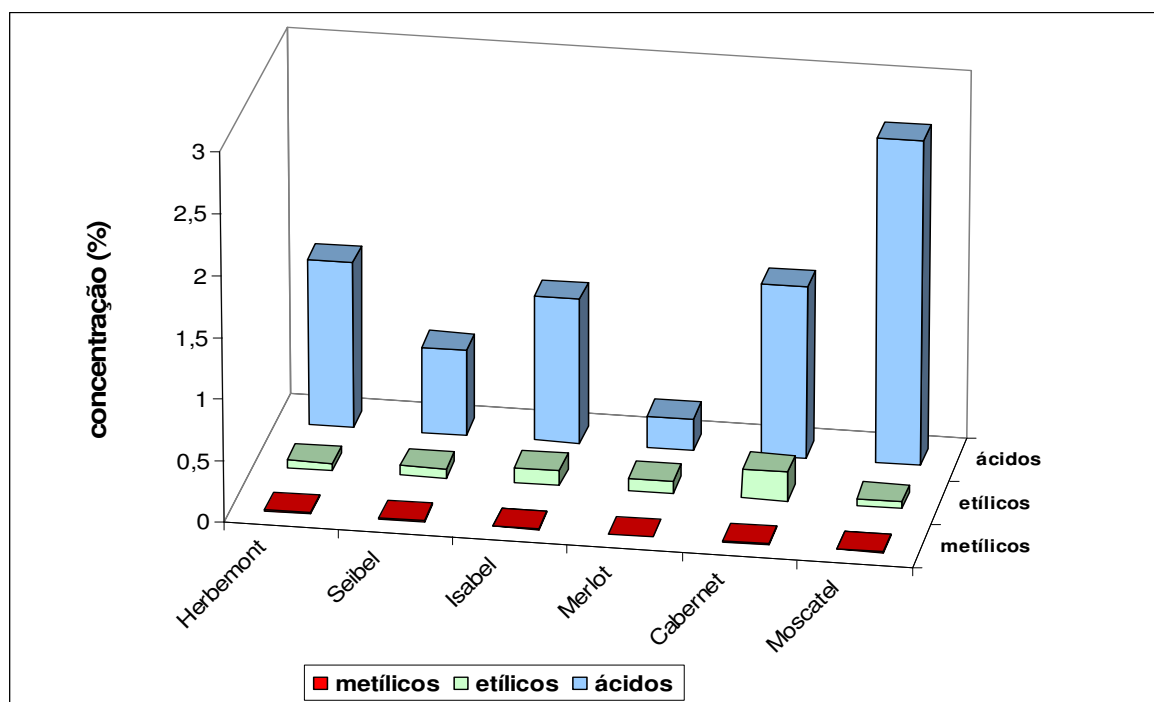


Figura 53: Análise quantitativa de compostos não ligados ao glicerol em amostras de diferentes variedades de semente de uva extraídas por PLE.

A grande diferença de concentração encontra-se no teor de ácidos graxos nas amostras de óleo de semente de uva. Sabe-se que os ácidos graxos livres presentes em óleos vegetais são oriundos do metabolismo da planta ou do processo de extração que o óleo sofreu. Como as amostras aqui estudadas foram extraídas da mesma forma, crê-se que a diferença dada entre o teor de ácidos graxos é devido à variedade de uva estudada.

A variedade Moscatel apresentou o óleo de semente de uva com maior concentração de ácidos graxos (2,6 %), porém esse conteúdo está dentro da faixa encontrada em óleos brutos que chega a 5 % de ácidos graxos livres em óleo vegetal. As demais amostras de óleo como Cabernet e Isabel/Herbemont apresentaram 1,4 % de acidez, seguida das sementes Isabel e Isabel/Seibel, 1,2 % e 0,7 respectivamente.

Compostos como ácidos graxos livres são retirados em sua grande maioria no processo de refinação e chegam a ser encontrado em até 0,5% do óleo comercial. Como as amostras analisadas encontram-se dentro da faixa limite de

óleos brutos, não há necessidade de um processo diferenciado para a produção e comercialização do óleo de qualquer uma destas variedades.

4.3.3 TRIACILGLICEROL

4.3.3.1 EXTRAÇÕES CLÁSSICAS: PRENSAGEM E SOXHLET

Os resultados quantitativos das amostras, das diferentes variedades de sementes de uvas, extraídas por prensagem, estão apresentadas na **Tabela XLIX**.

Tabela XLIX: Quantificação de triglicerídeos em óleos de semente de uva, de diferentes variedades, extraídos por prensagem e expressos em porcentagem em massa

| ECN | nome | HI | SI | ISA | MO | CA | ME |
|-----|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 38 | LLnLn | ND | 0,32 | 0,31 | 0,25 | 0,21 | ND |
| 38 | Isômero | ND | 0,04 | 0,04 | ND | ND | ND |
| 40 | LLLn | 0,58 | 0,77 | 0,66 | 0,67 | 0,64 | 0,66 |
| 40 | Isômero | ND | 0,06 | 0,07 | ND | ND | ND |
| 42 | LLL | 40,54 | 47,59 | 40,12 | 41,57 | 42,39 | 40,29 |
| 42 | PLLn | 0,27 | ND | ND | ND | ND | ND |
| 44 | OLL | 21,12 | 19,39 | 21,24 | 20,67 | 19,18 | 21,33 |
| 44 | PLL | 14,09 | 14,05 | 14,69 | 15,32 | 14,22 | 14,75 |
| 46 | OOL | 5,40 | 3,79 | 5,25 | 4,61 | 4,09 | 5,27 |
| 46 | POL + StLL | 12,20 | 10,48 | 11,82 | 11,85 | 13,28 | 11,87 |
| 46 | PPL | 0,16 | 0,12 | 0,20 | ND | 0,33 | 0,21 |
| 48 | OOO | 1,08 | 1,03 | 0,87 | 0,71 | 0,38 | 0,87 |
| 48 | StOL + (?) | 3,52 | 2,27 | 3,50 | 3,38 | 2,91 | 3,51 |
| 48 | (POP) | 0,41 | ND | 0,57 | ND | 0,65 | 0,57 |
| 48 | PPP | 0,46 | 0,09 | 0,64 | 0,26 | 0,24 | 0,64 |
| ? | ? | ND | ND | ND | 0,21 | 0,52 | ND |
| ? | ? | 0,18 | ND | ND | 0,51 | 0,97 | ND |

(P) palmítico, (L) linoléico, (O) oléico, (St) esteárico e (Ln) linolênico. ND: não detectado

Através da **Tabela XLIX** verifica-se a semelhança de resultados quanto ao triglicerídeos presentes em maior concentração nos óleos de todas as sementes de uvas estudadas. O triglicerídeo majoritário é a trilinoleína (LLL), seguindo de outros triglicerídeos (OLL, PLL e StLL + POL) que contém o ácido linoléico ligado a molécula de glicerol, confirmando assim os resultados da análise de ácidos graxos totais que mostra a grande concentração desse ácido graxo.

O exemplo apresentado na metodologia da AOAC mostra o triglicerídeo StOL e não identifica o outro triglicerídeo que coeluiu, porém ao estudar o gráfico de número equivalente de carbono (ECN) apresentado na parte experimental, página 55, constata-se que o possível triglicerídeo seja composto de um ácido graxo esteárico, um palmítico e um linoléico (StPL) ou um ácido graxo palmítico e dois oléicos (POO). O estudo baseado no triângulo de separação de triglicerídeos (TST) afirma que o StOL possui na soma de seus ácidos graxos 54 carbonos e 3 ligações duplas o que corresponde a ECN 48, por isso os triglicerídeos que podem coeluir com ele devem ter esse mesmo ECN 48 e n° de carbono 52 e 2 ligações duplas.

Por essa razão só poderia ser solucionada com a separação total dos picos e a confirmação através de padrões dos triglicerídeos, StPL e POO. Estudos da literatura quando discutem a coeluição desse pico apontam diferentes soluções para este problema.

As amostras comerciais e amostras extraídas por prensagem das diferentes uvas possuem aproximadamente 40 % de trilinoleína (ECN 42), com exceção do óleo de semente de uva extraído da mistura das variedades Isabel e Seibel. Como o óleo proveniente da variedade Isabel possuiu 40,12 % sugere-se que esse acréscimo é dado pela variedade Seibel. Esse mesmo óleo é o que possui menor concentração de POL + StLL (ECN 46) e PPP (ECN 48) A diferença de resultados dada por essas amostras são melhor visualizadas na **Figura 60**.

A menor quantidade de trioleína (OOO), ECN 48, foi encontrada no óleo de semente de uva da espécie Cabernet.

O óleo de semente de uva Carbernet apresentou, também, a menor concentração de ECN 44 (**Figura 54**), que corresponde à soma das concentrações dos triglicerídeos OLL e PLL (**Tabela XLIX**).

A concentração dos triglicerídeos que compõe ECN 38 (LLnLn) e ECN 40 (LLLn) são semelhantes entre si e possuem valores próximos a zero.

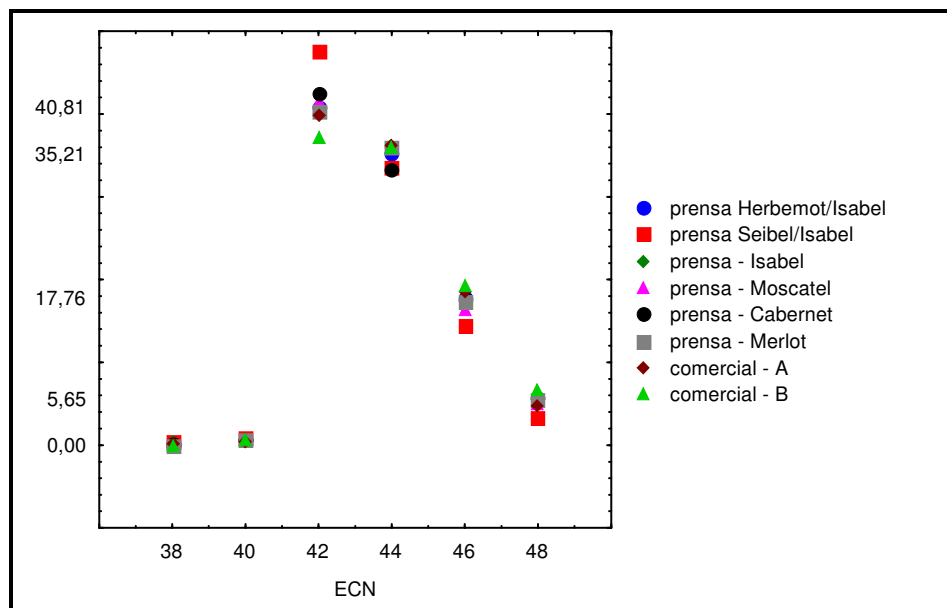


Figura 54: Gráfico da relação entre número equivalente de carbonos (ECN) e percentual de triglicerídeos para os óleos das diferentes variedades de uvas analisadas

Existem mais dois triglicerídeos que aparecem em algumas amostras de óleo de semente de uva que não são identificados na amostra de óleo de soja. Esses dois picos são eluídos após a PPP e por isso ao comparar a ordem de eluição dos picos presentes nas amostras de óleo de soja e óleo da semente de uva Cabernet, **Figura 55**, dada pelo TST, esses compostos deverão possuir ECN igual ou maior que 50.

Como a literatura [141] registra que existe um decréscimo de ácido linoléico e oléico em óleo vegetais que sofrem aquecimento, avaliou-se os teores destes TG em amostras óleo de semente de uva extraída por Soxhlet. Os resultados estão apresentados na **Tabela L**.

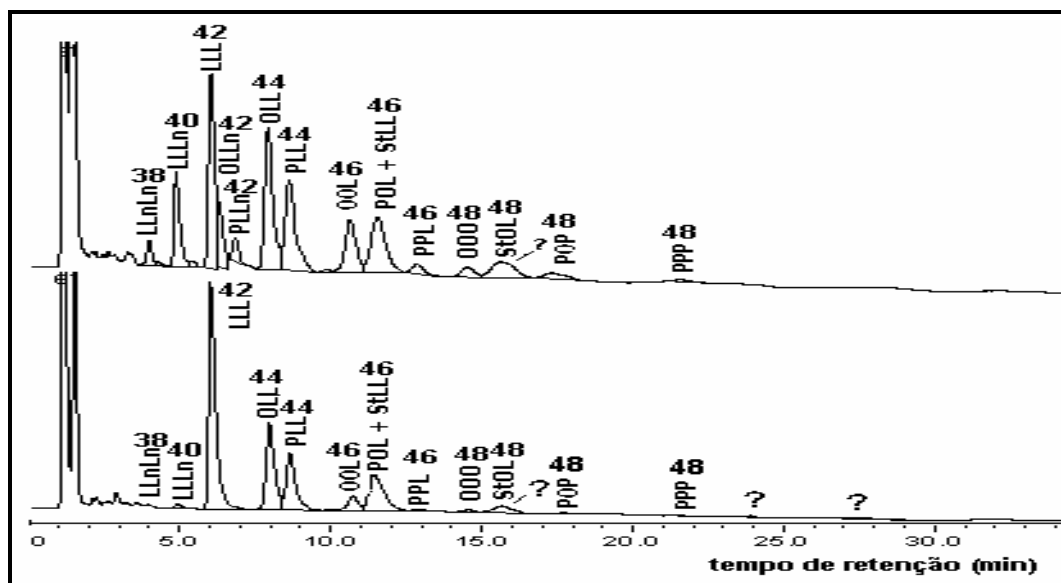


Figura 55: Cromatogramas da análise de triglicerídeos em (a) óleo de soja e (b) óleo de semente de uva Cabernet; ECN: número equivalente de carbonos. Condições cromatográficas citadas na **Seção 3.6.3.3, página 54**.

Tabela L: Quantificação de triglicerídeos em óleos de diferentes espécies de semente de uva extraídas por Soxhlet, expressos em porcentagem.

| ECN | nome | Soxhlet | | | | | |
|-----|------------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | HI | SI | ISA | MO | CA | ME |
| 38 | LLnLn | 0,12 | 0,70 | 0,57 | 0,53 | 0,40 | 0,14 |
| | Isômero | 0,07 | ND | 0,13 | ND | ND | ND |
| 40 | LLLn | 0,67 | 1,05 | 0,82 | 0,71 | 0,56 | 0,60 |
| | Isômero | 0,18 | 0,26 | 0,07 | 0,00 | 0,06 | ND |
| 42 | LLL | 41,53 | 47,05 | 37,18 | 45,16 | 39,26 | 45,16 |
| | PLLn | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 44 | OLL | 20,66 | 18,21 | 19,02 | 21,43 | 19,97 | 24,94 |
| | PLL | 13,64 | 13,18 | 13,97 | 15,17 | 16,46 | 9,32 |
| | OOL | 5,41 | 3,13 | 5,42 | 3,63 | 4,27 | 6,17 |
| 46 | POL + StLL | 11,58 | 9,62 | 14,38 | 11,20 | 12,13 | 9,78 |
| | PPL | 0,27 | ND | 0,36 | ND | 0,04 | 0,04 |
| | OOO | 1,25 | 1,26 | 2,26 | 1,02 | 2,36 | 0,90 |
| 48 | StOL + (?) | 3,44 | 4,32 | 5,72 | 1,14 | 4,07 | 2,79 |
| | POP | 0,60 | ND | ND | ND | 0,18 | 0,17 |
| | PPP | 0,26 | 1,23 | ND | ND | 0,26 | ND |
| | ? | | | | | | |

(P) palmítico, (L) linoléico, (O) oléico, (St) esteárico e (Ln) linolênico. ND: não detectado.

Ao avaliar a composição dos óleos extraídos em Soxhlet, apresentados na **Tabela L**, verificam-se a ausência dos dois compostos que saem após a eluição da tripalmitina (PPP) assim como a do triglicerídeo PLLn. Os resultados também confirmam a maior quantidade de LLL no óleo de semente de uva Seibel.

Os resultados obtidos da análise de triglicerídeos nas amostras extraídas em Soxhlet mostraram pouca diferença quantitativa em relação às amostras extraídas por prensagem, por isso pode-se dizer que a temperatura de extração ($\pm 70^\circ\text{C}$) utilizada não é suficiente para que ocorra grande alteração da concentração de triglicerídeos no óleo.

4.3.3.2 EXTRAÇÃO COM LIQUIDO PRESSURIZADO (PLE)

Os resultados quantitativos das amostras, das diferentes variedades de sementes de uvas, extraídas por prensagem, estão apresentadas na **Figura 56**. Os resultados estão expressos através do somatórios dos triglicerídeos que possui o mesmo ECN.

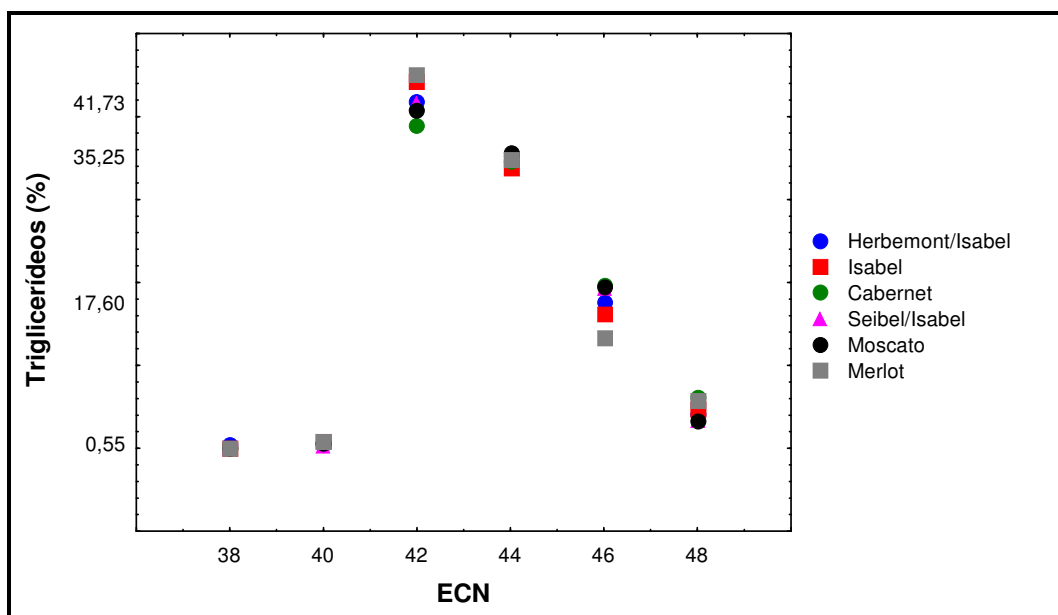


Figura 56: Relação entre número equivalente de carbonos (ECN) e percentual de triglicerídeos para os óleos das diferentes variedades de uvas analisadas extraídos por PLE.

Através da **Figura 56** verifica-se que os triglicerídeos que compõe o ECN 38, ECN 40 e ECN 44 possuem poucas diferenças em relação a concentração dos triglicerídeos.

As amostras de óleo de semente de uva Merlot e Isabel possuem a maior concentração de ECN 42, o que corresponde a LLL e a PLLn., por outro lado a amostra Cabernet possui a menor concentração entre as amostras. As demais amostras apresentaram concentrações semelhantes entre si.

Quando é analisado o ECN 46 (OOL, POL + StLL, PPL), verifica-se que as amostras Isabel e Merlot apresentam o menor resultado enquanto que a amostra Moscatel apresenta o maior resultado entre as amostras. As amostras apresentaram concentrações muito próximas para a análise de compostos que compõe o ECN 48.

4.3.4. COMPOSTOS ANTIOXIDANTES – VITAMINA E

Para a quantificação das amostras utilizou-se o procedimento de descrito na parte experimental, página 55. A curva de calibração utilizada para essas amostras foi a mesma utilizada para a amostras de Isabel/Herbemont apresentadas na página 143.

Os resultados referentes às análises dos óleos extraídos de diferentes variedades de sementes de uvas por prensagem, Soxhlet e PLE, estão apresentadas na **Figura 57**.

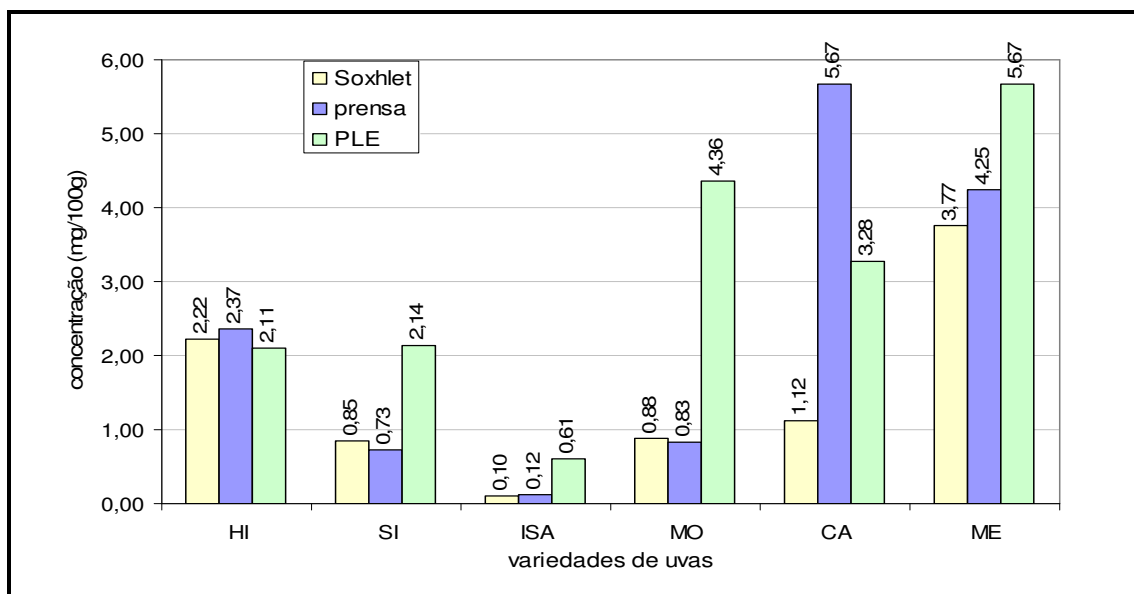


Figura 57: Concentração de α – tocoferol (mg Vit E/100 g de óleo) em amostras extraídas por prensagem, Soxhlet e PLE das sementes de diferentes variedades de uva.

A maioria das amostras extraídas com Soxhlet apresentou menor concentração de vitamina E que as amostras extraídas por prensagem e por PLE, provavelmente isso ocorra como efeito da temperatura aplicada nos dois últimos processos. As amostras HI, SI, ISA e MO apresentaram semelhantes concentrações nos dois métodos de extração clássicos.

As amostras que apresentaram maior diferença de concentração de vitamina E, entre os métodos de extração, foram as amostras extraídas com sementes de uva Cabernet, porém foi o óleo extraído por prensagem dessa variedade, em conjunto com o óleo da variedade ME extraída por PLE, que apresentou a maior concentração entre as amostras. Os menores resultados foram apresentados pelas amostras extraídas das sementes da variedade Isabel.

Os resultados da **Figura 57** demonstram que variedades de sementes de uva da espécie *Vitis viníferas* mostraram maiores concentrações de vitamina E em óleo de semente de uva extraído que as variedades híbridas. A variedade Merlot apresentou cerca de 6 mg/100g de vitamina E no óleo extraído por PLE, enquanto

que as variedades Moscatel e Cabernet apresentaram em torno de 4,5 e 3,5 mg/100g, respectivamente, para o mesmo processo de extração.

A maior diferença entre a técnica de PLE e as técnicas clássicas ocorreu para a variedade MO, sendo a concentração por PLE aproximadamente 5 vezes o valor encontrado para prensagem e Soxhlet.

Tendo em vista os resultados obtidos com o planejamento experimental com a semente de uva Isabel/Herbemont em hexano, sabe-se que a condição 3 (3 g, 1 ciclos, 30 min, 25 °C e 150 % de flush), foi a que proporcionou melhor rendimento de vitamina E, e não a condição 16 considerada “ótima”. Com isso há indicação de que a concentração real presente no óleo de semente de uva nas amostras de uva Isabel/Seibel, Moscatel, Cabernet e Merlot são superiores a concentração encontrada nessa análise.

Considerando os melhores resultados obtidos para o óleo de semente de uva Merlot e a ampla discussão encontrada na literatura sobre esta espécie, pode-se avaliar separadamente os óleos produzidos por diferentes processos de extração desta espécie de uva.

A variedade Merlot extraída por PLE em hexano apresentou o melhor resultado (5,7 mg /100g) para a concentração de α - tocoferol entre as extrações analisadas, porém a concentração deste analito foi menor quando extraída por Soxhlet (4,2 mg/100g). Comparado com dados da literatura, resultados superiores foram encontrados em trabalhos como o de Beveridge e colaboradores [63], que utilizaram a mesma variedade de semente de uva com extração por solvente com éter de petróleo (7,7 mg/100g) e com SFE em CO₂ (7,7 mg/100g). Porém, em trabalhos como de Oomah [101], resultados semelhantes foram encontrados, 5,6 mg/100g para amostra comercial e 3,4 mg/100g para amostras secas em microondas e extraídas com Soxhlet. Tendo em vista que os resultados encontrados na literatura e dados do planejamento experimental, estes resultados podem ser considerados dentro da faixa de concentração encontrada, e concluir que dentre as variedades estudadas esta é a uva que produz óleo mais rico em vitamina E.

Outro óleo de semente de uva estudado na literatura e com bons resultados neste trabalho, foi o extraído da semente de uva da variedade Cabernet.

Segundo Beveridge e colaboradores [63] a variedade Cabernet quando extraída com SFE apresentou 8,70 mg/100g (\pm 0,79) e quando extraída com o método Goldfisch 3,58 mg /100g (\pm 0,54). Quando extraído por Soxhlet, neste trabalho, a concentração permaneceu em torno de 1,1 mg/100g, resultados inferiores ao de Beveridge enquanto que quando extraída por PLE a concentração encontrada foi de 3,3 mg/ 100g. Os melhores resultados para o óleo extraído da semente Merlot foi obtido por prensagem, e apresentou cerca de 6 mg/100g de α - tocoferol.

Os resultados, da determinação de vitamina E em óleo de semente de uva, podem ser resumidos em três tópicos diferentes.

1 - O óleo de semente de uva Merlot apresentou maior concentração de vitamina E, quando extraído por PLE e Soxhlet, enquanto que o óleo de semente de uva Cabernet teve o maior teor de vitamina E entre as amostras extraídas por prensagem.

2 - As variedades de uva *Vitis viníferas* apresentaram maior concentração de vitamina E, que as amostras de semente de uvas híbridas (Isabel, Seibel, Herbemont).

3 - Comparando os métodos clássicos de extração, a prensagem produziu óleos com maior concentração de vitamina E que as amostras extraídas com Soxhlet. Já quando se analisa a concentração obtida por amostras extraídas com outros métodos, verifica-se que a maior concentração é dada para as amostras extraídas por PLE.

5 - CONCLUSÕES

5.1 CONCLUSÕES GERAIS

As metodologias desenvolvidas para a extração e caracterização do óleo de semente de uva mostraram eficiência, apresentando bons resultados de rendimento e composição química adequada, para a industrialização dos óleos extraídos.

As sementes de uvas híbridas são adequadas para a produção do óleo de semente de uva utilizado na indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica, podendo assim ser indicado a utilização deste resíduo para agregar valor à matéria prima inicial.

5.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

5.2.1 QUANTO A METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO

Os métodos de extração modernos (ultra-som, PLE e SFE) mostraram ser eficientes para extrair o óleo da semente de uva em diferentes condições, apresentando em alguns casos maior sensibilidade e seletividade.

5.2.1.1 Extração com Ultra-som (USE)

O ultra-som embora não tenha apresentado o melhor rendimento, mostrou ser capaz de extrair o óleo da semente de uva por um processo simples, barato e de fácil manuseio.

As variáveis utilizadas para a construção do planejamento estatístico na extração do óleo de semente de uva não apresentaram ser relevantes, dentro na faixa estudada, o que tornou os dados insuficientes para avaliar as variáveis que mais influenciaram no processo.

5.2.1.2 Extração com Líquido Pressurizado (PLE)

O planejamento estatístico, semi-fatorial, utilizado para a extração por PLE, apresentou-se adequado para facilitar o estudo e identificar as variáveis que mais influenciaram no processo de extração.

As variáveis tempo, número de ciclos e temperatura, mostraram ter efeitos significativos pronunciados sobre o rendimento de óleo extraído das sementes de uvas. A polaridade do solvente mostrou ter influencia dominante no processo de extração, tanto na quantidade de óleo como na qualidade do extrato obtido.

O método PLE, utilizando o diclorometano como solvente extrator, apresentou o maior rendimento em menor tempo de extração quando comparados a outros métodos empregados.

A PLE, por outro lado, apresentou maior concentração de ácidos graxos livres, indicando ser um método mais agressivo que tende a provocar quebras nas ligações, necessitando maiores cuidados na etapa de refinamento do óleo.

O método de extração por PLE mostrou ser mais seletivo para a extração de óleos com elevados teores de compostos antioxidantes como vitamina E e catequinas.

5.2.1.3 Extração com Fluido Supercrítico (SFE)

Além das vantagens inerentes ao processo, tais como a redução do tempo de extração e diminuição ou isenção de solventes no produto final, a SFE demonstrou ser altamente seletiva na extração de compostos de interesse com a vitamina E

Estudos realizados na SFE, utilizando propano como solvente extrator, mostraram melhores resultados quanto ao rendimento do óleo extraído, tempo e condições mais brandas (temperatura e pressão) para a extração de óleos vegetais.

O aumento de densidade e temperatura, nos processos de extração que utilizaram CO₂, favoreceu o rendimento do óleo extraído da semente de uva.

Este método de extração foi mais seletivo quando se variou a temperatura e a pressão, com isso apresentou maior variação entre as amostras estudadas, sendo por isso indicado para a classificação das sementes nos aspectos qualitativo e quantitativo.

5.3 QUANTO AO MÉTODO DE ANÁLISE

Os métodos cromatográficos de análises empregados se mostraram adequados para a caracterização e quantificação de compostos presentes no óleo de semente de uva. Através destes métodos foi possível identificar e quantificar os analitos presentes nas amostras.

As amostras de óleo de semente de uva extraídas por diferentes métodos de extração apresentaram perfil cromatográfico semelhante em relação aos constituintes majoritários tais como triglicerídeos e ácidos graxos totais. Porém, a cromatografia (gasosa e líquida) permitiu que componentes minoritários (ácidos graxos livres, vitamina E e compostos fenólicos) com diferenças significativas pudessem ser identificadas e quantificadas.

O uso de derivatizantes distintos (BSTFA e Metanol com o catalizador BF_3) possibilitou a realização de análises, na cromatografia gasosa, capazes de diferenciar, identificar e quantificar componentes inerentes a matriz.

5.4 QUANTO AOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS

Os ácidos graxos analisados em todas as amostras de óleo de semente de uva estão dentro da faixa de concentração exigida pela ANVISA, para óleo comercial comestível. Os ácidos graxos, linoléico e oléico, presentes em maior concentração no óleo de semente de uva, apresentaram concentrações em torno de 65 % e 22 %, respectivamente.

A utilização do BSTFA como derivatizante, facilitou a análise cromatográfica dos ácidos graxos livres presentes nos óleos de semente de uva, diferenciando dos alquil-ésteres já existentes no óleo.

Os triacilgliceróis do óleo de semente de uva apresentaram um perfil semelhante quando comparado aos do óleo de soja, sendo que a trilinoleína (LLL) apresentou maior concentração, aproximadamente 40 %.

O teor, de ácidos graxos livres e de ésteres etílicos, apresentou diferenças significativas. Os métodos utilizados para a extração do óleo de semente de uva, podem ser avaliados, empregando um método específico para a análise destes compostos.

A variedade de uva Merlot apresentou maiores concentrações de vitamina E que as demais sementes utilizadas na extração de óleo de semente de uva.

Para análise de compostos fenólicos, em amostras extraídas por prensagem e Soxhlet, faz-se necessário o uso de etapas para uma pré-concentração, a fim de verificar se realmente há presença desses componentes nas amostras extraídas. Por isso, pode-se dizer que estes métodos não são capazes de retirar este tipo de compostos presentes na semente de uva.

6 – PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS

A maior parte dos compostos que conferem sabor e odor desagradável para óleos vegetais são compostos voláteis de baixo peso molecular (aldeídos e cetonas) provenientes da quebra de moléculas, como os ácidos graxos, linoléico e oléico, ou do metabolismo da planta. Neste sentido é importante quantificar estes compostos e verificar se eles existem no óleo vegetal bruto para assim minimizar etapas no processo de refinação do óleo.

Óleos vegetais que possuem valor agregado necessitam de um controle maior de pureza, sendo os fitosteróis responsáveis pela impressão digital destes

óleos, faz-se necessário a quantificação destes analitos presentes no óleo de semente de uva.

Estudar novas metodologias de análise para glicerídeos onde seja diferenciada a ordem de ligação dos compostos na molécula.

A presença de compostos antioxidantes é importante para aumentar o valor agregado do óleo, como foi visto neste trabalho pode ser isolado estes compostos com o uso de um método de extração específico, como PLE. Para garantir que as condições do método de extração sejam adequadas, faz-se necessário a quantificação destes compostos nas diferentes condições de extração do óleo de semente de uva.

Tendo em vista a diferença de concentração de vitamina E entre as variedades de sementes de uvas, pode-se investigar novas espécies de uva e propor a exploração do óleo de semente de uva das variedades onde este composto for mais abundante.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Guerra, C.C.; Zanús, M.C.; *Maturação e Colheita*, Embrapa, **2003**, 1-5.
- 2 <http://www.biotechnologia.com.br/revista/bio29/biomassa.asp> acessado em 19/03/2007.
- 3 Oliveira, G.P.; Echevengúá, M.M.; Messias, R.S.; *Processo de extração e caracterização do óleo de semente de uva*, UFSC, Santa Catarina, 2003.
- 4 http://www.academiadovinho.com.br/brasil/br_classvin.htm acessado em 01/11/2005
- 5 Vinho, Tom Stevenson; tradução Bazán *Tecnologia e Lingüística*, Ed. Publicações, RJ, 1998.
- 6 Camargo, U. A.; *Uvas do Brasil*, Brasília, 1994.
- 7 <http://www.cnpuv.embrapa.br/servicos/vitivinicultura> acessada em 19/03/2007

- 8 Cottyn, B.G.; Bouque, C.V.; Aerts, J.V.; Buysse, F.X.; *Agriculture and Environment*, **1981**, 6, 283-294.
- 9 www.qmc.ufsc.br/qmacweb/docs/jovem_cientista_oleo_uva.doc acessado em 16/01/06.
- 10 Óleos e Gorduras Vegetais seus subprodutos protéicos, Rodolfo Rohr, 4^oed, 1978.
- 11 Allinger, N. L.; Cava, M. P.; Jongh, D. C.; Lebel, N. A.; Steves, C. L.; *Química Orgânica*, 2^oed., 171-173, 1976.
- 12 Robbers, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.E.; *Farmacognosia e Farmacobiocologia*, Editorial Premier, SP, **1997**.
- 13 <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482-99.htm>, acessado em 05/02/2004.
- 14 Moretto, E.; Fett, R; *Tecnologia de óleos e Gorduras vegetais na indústria de alimentos*, Ed. Varela , São Paulo,1998.
- 15 Gómez, A.M.; López, C.P.; de la Ossa, E.M.; *The Chemical Engineering Journal*, **1996**, 61, 227-231.
- 16 Kamel, B.S.; Dawson, H.; Kakuda, Y.; *JAOCS*; **1985**, 62, 5, 881-883.
- 17 Basile, D.; *Alimentos & tecnologia*, **1986**, 19, 13
- 18 Thoe, T.B.; Aspinwall, D.K.; Wise, M.L.H.; *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, **1998**, 38, 4, 239-255.
- 19 Barboza, J.C.S.; Serra, A.A.; *Química Nova*; SP, **1992**, 15, 4, 302-316.
- 20 Raynie, D.E.; *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 4659-4664.
- 21 Ranalli, A.; Contento, S.; Lucera, L.; Pavone, G.; Di Giacomo, G.; Aloisio, L.; Di Dregorio, C.; Mucci, A.; Kourtikakis, I.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 4795-4801.
- 22 Adewuyi, Y.G.; *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2001**, 40, 4681-4715.
- 23 Ametaj, B.N.; Bobe, G.; Lu, Y.; Young, J.W.; Beitz, D.C.; *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 2105-2110.
- 24 Breitbach, M.; Barthen, D.; Schmidt-Traub, H.; *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2003**, 42, 5635-5646.
- 25 Benedito, J.; Mulet, A.; Velasco, J.; Dobarganes, M.C.; *J. Agric. Food Chem.*,

- 2002**, 50, 4531-4536.
- 26 Mozajska, H. G.; Browski, L.; Namiesnik, J.; *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2001**, 31, 3, 149-165.
 - 27 Ábalos, M.; Bayona, J.M.; Pawliszyn, J.; *Journal of Chromatography A*, **2000**, 873, 107-115.
 - 28 Bruce E. Richter, Brian A. Jones, John L. Ezzell, and Nathan L. Porter, Nebojsa Avdalovic and Chris Pohl; *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 1033-1039.
 - 29 Pörschmann, J.; Plugge, J.; Toth, R.; *Journal of Chromatography A*, **2001**, 909, 95-109.
 - 30 Moreau, R.A.; Powell, M.J.; Singh, V.; *JAOCs*, **2003**, 80, 11, 1063-1067.
 - 31 Toschi, T.G.; Bendini, A.; Ricci, A.; Lercker, G.; *Food Chemistry*, **2003**, 83, 551-555.
 - 32 Sanagi, M. M.; See, H.H.; Ibrahim W. A. W.; Naim, A. A.; *Analytica Chimica Acta*, 538, 2005, 71–76.
 - 33 Taylor, L.T.; *Supercritical Fluid Extraction – Techques in Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Inc, New York, 1996.
 - 34 Luque de Castro, M. D. ; Valcácel, M. ; Tena, M. T.; *Analytical Supercritical Fluid Extraction*, Springer; Heidelberg, 1994.
 - 35 Chester, T.L.; Pinkston, J.D.; Raynie, E.D.; *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 106R-130R.
 - 36 Lanças, F. M.; Galhiane, M. S.; Rissato, S. R., J.; Clifford, P. (Ed.); *Supercritical Fluid Methods and Protocols*, London: Humana Press. 2000, 1375-1381.
 - 37 Knowles, D. E.; Richter, B. E.; Wygant, M. B.; Nixon, L.; Andersen, M. R. *Journal Association of Analytical Chemistry*, **1988**, 71, 3, 451-457.
 - 38 Maul, A.A.; Wasicky, R.; Bacchi, E.M.; *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **1998**, 5, 2, 185-200.
 - 39 McNally, M. E. P. *Journal of the American Association of Oficial Analytical Chemists International*, Washington, **1996**, 79, 2, 380-387.
 - 40 Queckenber, Queckenberg, O. R.; Frahm, A. W. *Pharmazie*, **1994**, .49, 159-166.
 - 41 Adams, M. K. *Analysis of Coffee: Production and Trade*, 1-30, 1991.

- 42 Anklam, E.; Muller, A. *Pharmazie*, **1995**, 50, 364-365.
- 43 Vega, P. J.; Balaban, M. O.; Sims, C. A.; O'Keefe, S. F.; Cornell, J. A. *Journal Food Science*, **1996**, 61, 4, 757-759.
- 44 King, J. W.; List, G. R. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **1996**, 435.
- 45 Lim, S.; Hartland, S. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **1996**, 73, 423-429.
- 46 Gopalakrishanan, N.; Narayman, C. S. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1991**, .39, 1976-1978.
- 47 Trease, G. E.; Evans, W. C. *Pharmacognosy*. 14.ed. London: W. B. Saunders, 1996. 120.
- 48 Rodrigues, M. R. A.; Caramão, E. B.; Dos Santos, J. G.; Dariva, C.; Oliveira, J. V. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, .2, 453-456.
- 49 Reverchon, E. *Journal of Supercritical Fluids*, **1997**, .10, 1-37.
- 50 Degnan, A. J.; von Elbe, J. H.; Hartel, R. W. *Journal Food Science*, **1991**, .56, .6, 1655-1659.
- 51 Fontana, J. D.; Lanças, F. M.; Passos, M.; Cappelaro, E.; Vilegas, J.; Baron, M.; Nosedá, M.; Pomílio, A. B.; Vitale, A.; Webber, A. C.; Maul, A. A.; Peres, W. A.; Foerster, L. A. *Applied Biochemical and Biotechnology*, **1998**, 70, 72, 67-76.
- 52 Kerrola, K. *Food Reviews International*, **1995**, 11, .4, 547-573.
- 53 Gonçalves, M.; Vasconcelos, A. M. P.; Azevedo, E. J. S. G.; Neves, H. J. C. Ponte. *Journal of American Oil Chemistry Society*, **1991**, .68, .7, 474-480.
- 54 Stahl, E.; Schütz, E.; Mangold, H.K.; *J. Agric. Food Chem.*, **1980**, 28, 1153-1157.
- 55 Alkio, M.; Gonzalez, C., Jantti, M.; Aaltonen, O., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2000**, 77, 315- 319.
- 56 Calvey, E.M.; McDonald, R.E., Page, S.W., Mossoba, M.M., Taylor, L.T.; *J. Agric. Food Chem.*; **1991**, 39, 542-547.
- 57 Gomez, A. M.; Ossa, E, M.; *Chemical Engennering Journal*, **2002** 88, 103-109.
- 58 Papamichail, I.; Louli, V.; Magoulas, K.; *Journal of Supercritical Fluids* **2000**, 18, 213-226.

- 59 Penedo, P.L.M.; Coelho, G.L.V.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **1997**, 17, 4.
- 60 Araújo, J.M.A.; Nicolino, A.P.N.; Blatt, C.; *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **2000**,35,1, 201-205 .
- 61 Taylor, L.T.; Ashraf-Khorassani, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 2440-2444.
- 62 Lee, W.Y.; Cho, Y.J.; Oh, S.L.; Park, J.H.; Cha, W.S.; Jung, J.Y.; Choi, Y.H.; *Food Sci. Biotechnol.*, **2000**, 9, 174 - 178.
- 63 Beveridge, T.H.J.; Girard, B.; Kopp, T.; Drover, J.C.G.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, 53, 1799 -1804.
- 64 Hierro, M. T. G.; *Temas Avanzados de Análisis Químicas*, Edinford S.A., Madrid,**1994**.
- 65 Sargenti, S. R.; Lanças, F. M. *International Symposium on Capillary Chromatography*, 16, Riva Del garda. **1994**.1800-1812.
- 66 Carvalho Jr., R.N.; Corazza, M.L.; Cardozo-Filho, L.; Meireles, M.A.A.; *Journal of Chemical and Engineering Data* **2006**, 51, 3, 997-1000.
- 67 Gnayfeed, M.H.; Daood, H.G.; Illés, V.; Biacs, P.A; *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 2761-2766.
- 68 Illés, V.; Daood, H.G.; Perneckzi, S.; Szokonya, L.; Then, M.; *Journal of Supercritical Fluids*, **2000**, 17, 177-186.
- 69 Illés, V.; Szalai, O.; Then, M.; Daood, H.; Perneckzi, S.; *Journal of Supercritical Fluids*, **1997**, 10, 209-218.
- 70 Lanza, M.; Comportamento de fases dos óleos de Oliva, soja e mamona em butano e propano a alta pressão; Universidade Regional Integrada – Campus Erechim; 2004.
- 71 Scurto, A.M.; Xu, G.; Brennecke, J.F.; Stadtherr, M.A.; *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2003**, 42, 6464-6475.
- 72 Lemert, R. M.; Johnston, K. P.; *Industrial Engineering Chemical Research*, **1991**, .30, 1222-12228.
- 73 Doobs, J.M.; Wong, J.M.; Johnston, K.P.; *J. Chem. Eng. Data.* **1996**, 31, 303-308.
- 74 Doobs, J.M.; Wong, J.M.; Lahiere, R.J.; Johnston, K.P; *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1987**, 26, 56-65.

- 75 Araújo, J. M.A.; *Química dos Alimentos Teoria e Prática*, 3ªed,Ed. UFV, Viçosa,1994.
- 76 Montoanari, L.; King, J.W.; List, G.R.; Rennick, K.A.; *Journal of Food Science*, **1996**, 61, 1230-1233.
- 77 Murga, R.; Ruiz, R.; Beltrán, S.; Cabezas, J.L.; *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 3408-3412.
- 78 Murga, R.; Sanz, M.T.; Beltrán, S.; Cabezas, J.L.; *Journal of Supercritical Fluids* **2002**, 23, 113-121.
- 79 Barton, A.F.M.; *Chemical Reviews*, **1975**, 75, 731-753.
- 80 Buldini, P.L.; Ricci, L.; Sharma, J.L.; *Journal of Chromatography A* **2002**, 975, 47-70.
- 81 Pellerin, P. *Perfummer and Flavorist*, Wheaton, **1991**, .16, 37-39.
- 82 Alonso-Salces, R.M.; Korta, E.; Barranco, A.; Berrueta, L.A.; Gallo, B.; Vicente, F.; *J. Agric.Food Chem*, **2001**, 49, 3761-3767.
- 83 Bruhl, L. e Matthäus, B. *Fresenius J. Anal. Chem*, **1999**. 364,631-634.
- 84 Ziller, S.; *Grasa y Aceites Alimentarios*, Azaragoza , Espanha, 1994.
- 85 Sovová, H.,Zarevúcka, M., Vacek, M., Stránský, K., *Journal of Supercritical Fluids* , **2001**, 20,15-28.
- 86 Gliszczynska-Swiglo, A.; Sikorska, E.; *Journal of Chromatography A*, 1048, **2004**, 195-198.
- 87 Frankel, E.N.; *Food Chemistry*, 57, **1996**, 51-55.
- 88 Señoráns, F.J.; Ibañez, E.; *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 465, 131-144.
- 89 Bruneton, J.; *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*, Ed. Acribia S.A, Zaragoza, 72-95, 1991.
- 90 Bonvehí J.S.; Torrentó, M.S.; Coll, F.V.; *JAOC*, 3, 78, **2001**, 305-310.
- 91 Holser, R.A.; Bost, G.; Boven, M.V.; *J. Agric.Food Chem*, **2004**, 52, 2546-2548.
- 92 Bortolomeazzi, R.; Cordaro, F.; Pizzale, L.; Conte L.S.; *J. Agric.Food Chem*, **2003**, 51, 2394-2401.
- 93 Cert, A.; Lanzón, A.; Carelli, A.A.; Albi, T.; *Food Chemistry*, **1994**, 49, 287-

- 293.
- 94 Moreau, R.A.; Singh, V.; Hicks, K.B.; *J. Agric. Food Chem*, **2001**, 49, 3793-3795.
- 95 Abidi, S.L.; *Journal of Chromatography A*, **2000**, 881, 197-216.
- 96 Rodrigo, N.; Alegría, A.; Barberá, R.; Farré, R.; *Journal of Chromatography A* **2002**, 947, 97-102.
- 97 Ahmed, M.K.; Daun, J.K.; Przybylski, R.; *Journal of Food Composition and Analysis* **2005**, 18, 359-364.
- 98 Osakada, F.; Hashino, A.; Kume, T.; Katsuki, H.; Kanenko, S.; Akaike, A.; *Neuropharmacology* **2004**, 47, 904-915.
- 99 Au Yeung, K.J.; Smith, A. Zhao, A.; Madden, K.B.; Elfrey, J.; Sullivan, C.; Levander, O.; Urban, J.F.; Shea-Donohue, T.; *Experimental parasitology* **2005**, 109, 201-208.
- 100 Pellegrini, N.; Visioli, F.; Buratti, S.; Brighenti, F.; *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 2532-2538.
- 101 Oomah, B.D.; Liang, J.; Godfrey, D.; Mazza, G.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4017-4021.
- 102 Yilmaz, Y.; Toledo, R.T.; *Trends in Food Science & Technology* **2004**, 15, 422-433.
- 103 http://www.ipv.pt/millennium/Millennium_19.htm acessada 19/03/2007
- 104 Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 4.ed. Califórnia: Willey, 1981.
- 105 Bertsch, W.; Jennings W. G.; Kaiser, R. *Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography*, Vol I. Edited by P. Sandra: Belgium State University of Ghent, 1985. 265.
- 106 Linskens, H. F.; Jakson, J. F. (Ed.) *Modern Methods of Plant Analysis*: Sringer-Verlag, 1987. New York, London, Paris, Tokyo: 5 248 S., 74 Abb., 23 Tab.
- 107 Derome, A. E. *The use o NMR Spectroscopy in the Structure Determinations of Natural Products: Two Dimensional Methods*. 6, 111-141. 1989.
- 108 Marcano, D.; Hasegawa, M. *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela. Consejo de desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, 1991, 17-38.

- 109 Fischer, N. H.; Vargas, D.; Menelaou, M. *Modern Phytochemical Methods*, New York: Plenum Press, 1991, 578.
- 110 Cordell, G. A. *Phytochemistry*, **1995**, 40, 6, 1585-1612.
- 111 Phillipson, J. D. A matter of some sensitivity. *Phytochemistry*, **1995**, 6, 38 1319-1343.
- 112 Gunter, H. NMR spectroscopy. *Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*. Second edition. John Wiley & Sons, 432. 1995.
- 113 Baldwin, M. A.. *Natural Products Reports*, 33-44, 1995.
- 114 Rucker, G.; NEugebauer, M.; Willems, G. G.; *Intrumentelle Pharmazeutische Analytik*. Stuttgar: Wissenschaftliche, 1998.
- 115 Lanças, F. M., *Cromatografia em Fase Gasosa*, ACTA, São Carlos (SP) 1993.
- 116 Harris, D., C.; *Análise de Química Quantitativa*, 6° ed, ed. LTC, Rio de Janeiro (RJ), 2005.
- 117 Lough; W., J., and Wainer I., W.; *High Performance Liquid Chromatography. Fundamental Principples and Praticce*; Blachie academic & Professional; London, 1997.
- 118 Meyer, V., R.; *Practical High-Performance Liquid Chromatography*; 2° ed; ed John Wiley & Sons, New York; 1993.
- 119 Seppänen-Laakso, T.; Laakso, I.; Hiltunen, R.; *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 465, 39-62.
- 120 Li D.; Park, J.; Oh, J.; *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 3089-3095.
- 121 Gamazo-Vázquez, J.; García-Falcón, M.S.; Simal-Gándara, J.; *Food Control*, **2003**, 14, 463-467.
- 122 Gamazo-Vázquez, J.; García-Falcón, M.S.; Sial-Gandara, J.; *Food Control*, **2003**, 14, 463-467.
- 123 Vicario, I.M.; Griguol, V.; León-Camacho, M.; *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 134-139.
- 124 De A. W. Stott e R. P. Evershed, *Anal. Chem.* ,**1996**, 68,4402.
- 125 Zhang, K. e Zuo, Y.; *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52, 222-227.
- 126 Saitta, M.; Lo Curto S.; Salvo, F.; Di Bella, G.; Dugo, G.; *Analytica Chimica*

- Acta*, **2002**, 466, 335–344.
- 127 Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; *Planejamento e Otimização de Experimentos*; Ed. UNICAMP, Campinas, 1996.
- 128 Wehrlé, P.; Nobelis, A.; Stamm, A. *Science Technologie Pharmaceutique* **1989**, 5, 6/7 , 471-489.
- 129 Miller, J. C.; Miller, J. N. *Estatística para Química Analítica*. Segunda Edición, 1993, 209.
- 130 Davies, L. Efficiency in Research, *Development and Production: the Statistical Design and Analysis of Chemical Experiments*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 1993.
- 131 Montgomery, D. C. *Diseño y Análisis de Experimentos*. México: Iberoamérica, 1991.
- 132 Linden, R. *Desenho Estatístico de Experimentos e Análise de Superfície de Respostas Aplicadas ao Desenvolvimento de Formas Farmacêuticas Sólidas Derivadas da Paciflora eduli*, UFRGS; 1998.
- 133 Yates, F. *Technical Communication*, 35, Bucks: Commonwealth Agricultural Bureau, 1935.
- 134 Pinto, José Carlos. *Otimização de Planejamento de Experimentos*, Petrobras, SERC/CEN-SUD, RJ, 1998.
- 135 Herman, A. S. **Biomedical Applications of Gas Chromatography**. New York: Plenum Press, 1964.
- 136 Metcalfe, L. D.; Schimitz, A. A. *Analytical Chemistry*, **1961**, 33,.3, 363-364.
- 137 Metcalfe, L. D.; Schimitz, A. A.; Pelka, J. R. *Analytical Chemistry*, **1966**, 38, 3, 514-515.
- 138 El – Hamdy, A.H.; Perkins, E.G.; *JAOCS*, **1981**, 28, 867-872.
- 139 Collins, C H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Introdução a Métodos Cromatográficos*, Ed. Unicamp, 5° ed. Campinas, 1993.
- 140 Warner, K.; Neff, W. E.; Byrdwell, W. C.; Gardner H. W.; *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 899-905.
- 141 Takeoka, G.R.; Full, G.H.; Dao, L.T.; *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 3244-3249.

8 – CURRICULUM DA AUTORA

Participações em Congressos e Jornadas

FREITAS, L. dos S.; Caramao, E. B. ;. Determinação de Ácidos Graxos Insaturados em Óleo de Semente de Uva: Comparando os Métodos de Extração com Soxhlet, Ultra-som e ASE. In: XXVI Congresso Latino Americano de Química e 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador. Anais do XXVI CLAQ e da 27 RASBQ, 2004.

FREITAS, L. dos S.; CARAMAO, E. B. Extração Acelerada com Solvente (ase) como Técnica de Extração de piper gaudichaudianum;.. In: XXVI Congresso Latino Americano de Química e 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador. Anais do XXVI CLAQ e da 27 RASBQ, 2004.

FREITAS, L. dos S.; CARAMAO, E. B. ;. Determinação de Ácidos Graxos Insaturados em Óleo de Semente de Uva: Comparando os Métodos de Extração com Sohlet, Ultra-som e ASE. In: XXVI Congresso Latino Americano de Química e 27 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador. Anais do XXVI CLAQ e da 27 RASBQ, 2004

FREITAS, L. dos S. CARAMAO, E. B. ; ZINI, C. A.; SOUZA, C. G de . Influence of Temperature in Accelerated Solvent Extraction of Grape Seed Oil. In: 28th International Symposium on Capillary Chromatography & Electrophoresis, 2005, La Vegas. Anais do 28th ISCCE, 2005. v. 1. p. 17.

FREITAS, L. dos S. CARAMAO, E. B. ; ZINI, Influência da Temperatura na Extração Acelerada com Solventes de óleo de Semente de Uva. In: 1º congresso Ibero-Americano de Química Analítica e 13º Encontro de Química Analítica, Niteroi, RJ. Resumo 615, seção C56, 2006.

Artigos Publicados em Revistas Indexadas

dos Santos, L.S.; Vale, M.G.R; de-Araujo, M.B.C.; Caramão, E.B.; Oliveira-EC, “*Application of SPME in pre-concentration of chlorinated phenolic compounds from cellulose bleaching effluents*”, **Journal of Separation-Science**; v. 24, nº (4), p. 309-312, 2001.

dos Santos Lisiane S., Franken L., Elina B. Caramão, Tania M. H. Costa e Edilson V. Benvenuti, “*Xerogel p-anisidinapropilsílica. estudo da estabilidade térmica e da resistência à lixiviação com solventes*”, **Química Nova**,v. 25, nº4, p. 563-566, 2002.

FREITAS, L. S. ; ARAÚJO, M. B. C. de ; VALE, M. G. R. ; CARAMÃO, E. B. . “*Application of activated carbon in the characterization of nitrogen compounds and phthalates in a landfill leachate*”. **Microchemical Journal**, v. 78, p. 61-64, 2004.

FREITAS, L. S. ; NASCIMENTO FILHO, I. ; S., P. ; MELECCHI, M. I. S ; VALE, M. G. R. ; CARAMÃO, E. B. . “*Selective extraction of benzoic acid from landfillleacheate by solid-phase extraction and ion-exchange chromatography*”. **Journal of Chromatography - A**, v. 1027, p. 167-170, 2004.

FREITAS, L. S. ; CARAMÃO, E. Bastos ; R. A. Jaques ; V. F. Pérez ; Cláudio Dariva ; Ana Paula de Oliveira ; José Vladimir de Oliveira . *Chemical composition of mate tea leaves (Ilex paraguariensis): A study of extraction methods*. **J. Sep. Sci.**, 29,v. 29, p. 2780-2784, 2006.

FREITAS, L. S. ; CARAMÃO, E. B. ; Jaques, R. A. ; Pérez, V. F. ; Dariva, C. ; Oliveira, A. P. ; de Oliveira, J. V.; The use of ultrasound in the extraction of Ilex paraguariensis leaves:A comparison with maceration. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2007, no prelo.

6. Artigos submetidos em Revistas Indexadas

FREITAS, L. S. ; CARAMÃO, E. B. ; Jaques, R. A. ; Pérez, V. F. ; Krause, L., Dariva, C. ; Oliveira, J. V.; Optimization of pressurized Liquid Extraction of yerba mate (Ilex paraguariensis) leaves. *Journal Separation Science*, 2007.

ANEXO 1:
ANÁLISE QUALITATIVA DA FRAÇÃO INSAPONIFICÁVEL EM ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA, DA MISTURA DAS VARIEDADES ISABEL E HERBEMONT, EXTRAÍDOS COM LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE) USANDO DIFERENTES SOLVENTES NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2⁵⁻¹.

Tabela 1.1: SOLVENTE: HEXANO: DCM (1:1)

| Nº | fórmula | nome | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|----|--|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | C ₈ H ₁₈ O ₂ Si | ácido dimetil propanóico (*) | | | | | | | X | | X | | X | | X | X | X | X |
| 2 | C ₁₁ H ₁₈ OSi | feniletanol (*) | X | X | X | | X | | X | X | X | | | | | X | X | X |
| 3 | C ₉ H ₁₈ O ₄ Si | etil succinato (*) | | | | | | | X | | X | X | X | X | X | | X | X |
| 4 | C ₁₂ H ₃₀ O ₄ Si | tri etilenoglicol(*) | X | | | | X | | | | | | | | | | | |
| 5 | C ₁₁ H ₁₆ O ₂ Si | ácido benzenoacético (*) | | | | | | | | | | | | X | | | | |
| 6 | C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si | ácido octanóico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | X | X |
| 7 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃ | glicerol (*) | X | T | X | | X | | X | | X | | | | | | X | X |
| 8 | C ₁₀ H ₁₆ O | decadienal | X | X | X | X | | X | X | X | X | X | X | | X | X | | X |
| 9 | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | caprato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | | X | X | X | X | X | | X |
| 10 | C ₁₃ H ₂₈ O ₂ Si | ácido cáprico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X | X |
| 11 | C ₁₄ H ₂₄ O ₄ Si ₂ | ácido isovanílico(*) | | | | | | | | | | | X | X | | | | X |
| 12 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | laurato de etila | X | X | | X | X | | X | X | X | X | X | X | X | | | |
| 13 | C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si | ácido laurico (*) | | | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 14 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | miristato de etila | X | X | | X | X | | X | | X | X | X | X | X | | X | X |
| 15 | C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si | ácido mirístico (*) | | | | | X | | X | X | | X | X | X | X | | X | X |
| 16 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | palmitato de metila | | | | | X | | X | | | | | | | X | | X |
| 17 | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | palmitoleato de etila | | X | | | X | | | | | | | X | | X | | X |
| 18 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | palmitato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 19 | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ Si | ácido palmitoleico (*) | | | | | | | X | | X | | X | X | | | | X |
| 20 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | ácido palmítico (*) | | | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 21 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | linoleato de metila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 22 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | oleato de metila | | X | X | | X | X | X | | X | | X | X | X | X | | X |
| 23 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | linoleato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 24 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | oleato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 25 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | inolenato de etila | X | X | | X | X | X | X | X | | X | X | X | X | X | X | X |
| 26 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | estearato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 27 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | ácido linoléico (*) | | | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 28 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | ácido oléico (*) | | | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 29 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | ácido linolênico (*) | | | | | | | X | X | X | | X | X | X | | X | X |
| 30 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | ácido esteárico (*) | | | | | | | X | X | X | X | X | | | | | X |
| 31 | C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si | monopalmitina (*) | | | X | | X | | X | | | | | | | | X | X |
| 32 | C ₂₇ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | molinoleina (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 33 | C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂ | monooleina (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 34 | C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si ₂ | monoestearina (*) | | | | | X | | | | | | | | | | | X |
| 35 | C ₃₀ H ₅₀ | escaleno | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 36 | C ₂₈ H ₄₈ O | brassicasterol | | X | X | X | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 37 | C ₃₁ H ₅₆ OSi | campesterol (*) | X | | | | X | X | | | | | | | X | X | | X |
| 38 | C ₂₉ H ₅₀ O | clionasterol | | | | | | | | | X | X | X | X | X | | | |
| 39 | C ₃₂ H ₅₆ OSi | estigmasterol (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X | X | X |
| 40 | C ₃₂ H ₅₈ OSi | sitosterol (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | X | X | X |

(*) detectado como derivado siliilizado (TMS).

Tabela 1.2: SOLVENTE: DICLOROMETANO

| Nº | fórmula | nome | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|----|--|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | C ₉ H ₂₀ O ₂ Si | ácido caproico (*) | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| 2 | C ₁₀ H ₁₄ | tetrametil benzeno | X | T | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | C ₁₂ H ₂₆ | dodecano | X | | | | | | | | X | | | | | | | |
| 4 | C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | caprilato etila | X | X | X | X | | | X | X | | | | | | | | |
| 5 | C ₁₀ H ₂₂ O ₂ Si | ácido heptanóico (*) | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| 6 | C ₁₁ H ₂₂ O ₂ Si | ácido octenoico (*) | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| 7 | C ₈ H ₁₈ O ₂ Si | ácido propionico (*) | | | | X | X | | | X | X | | X | | | | X | |
| 8 | C ₁₁ H ₁₈ OSi | fenil etanol(*) | | X | | X | X | X | X | X | X | | X | | X | | | X |
| 9 | C ₉ H ₁₈ O ₄ Si | succinato de etila (*) | | | | X | | | X | X | X | | | | | | | X |
| 10 | C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂ | ácido succínico (*) | | | | | | | | | | | | | | | | X |
| 11 | C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si | ácido caprílico (*) | | | | X | X | X | X | X | X | X | | X | X | | X | X |
| 12 | C ₁₀ H ₂₆ O ₃ Si ₂ | dietileno glicol (*) | | | | X | | | | | | | | X | | | | X |
| 13 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃ | glicerol (*) | | | | X | X | X | X | X | X | | X | | | | | X |
| 14 | C ₉ H ₂₇ O ₄ PSi ₃ | ac. fosforico (*) | | | | X | X | X | X | X | | | X | | | | | |
| 15 | C ₁₀ H ₁₆ O | decadienal | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X | | | | | X |
| 16 | C ₁₀ H ₂₀ O ₄ Si ₂ | ácido fumarico (*) | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| 17 | C ₁₁ H ₁₆ O ₂ Si | ácido benzenoacético (*) | | | | | | | | X | | | | | | | | X |
| 18 | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | caprato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X | X | X | | X |
| 19 | C ₁₂ H ₂₆ O ₂ Si | ácido pelargônico (*) | | | | | | X | X | | X | X | X | X | X | X | | X |
| 20 | C ₁₃ H ₃₄ O ₃ Si ₃ | metil propanotriol (*) | | | | | | | | | | | | | | | | X |
| 21 | C ₁₃ H ₂₈ O ₂ Si | ácido capríco (*) | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 22 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | laurat de etila | X | X | X | X | X | | X | X | | | X | | X | X | X | X |
| 23 | C ₁₄ H ₃₂ O ₃ Si | ac hidroxí octanoico(*) | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| 24 | C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si | ácido láurico (*) | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X | X | X |
| 25 | C ₁₄ H ₃₀ O ₄ Si | ácido subérico (*) | | | | X | | X | | X | | X | | | | | | |
| 26 | C ₁₅ H ₃₂ O ₄ Si ₂ | ácido azelaico (*) | | | | X | | X | X | X | | | X | | | | | X |
| 27 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | miristato de etila | X | X | X | | X | X | X | | | | X | | X | X | | X |
| 28 | C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si | ácido mirístico (*) | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X | X | X |
| 29 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | palmitato de metila | X | X | X | | X | X | X | | | | X | | | X | X | |
| 30 | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | palmitoleato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X | X | | | |
| 31 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | palmitato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 32 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ Si | ácido palmítico (*) | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | | |
| 33 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | ácido palmítico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 34 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | linoleato de metila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 35 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | oleato de metila | X | X | X | X | X | X | X | | X | X | X | | | X | X | |
| 36 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | linoleato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 37 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | oleato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 38 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | linolenato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X | X | X | X | X |
| 39 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | estearato de metila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 40 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | ácido linoléico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 41 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | ácido oléico (*) | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 42 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | ácido linolênico (*) | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | |
| 43 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | ácido esteárico (*) | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 44 | C ₂₁ H ₃₈ O ₂ | isopropil linoleate | | | | | | | | | | | | | | | X | X |
| 45 | C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | monopalmitina (*) | | | | X | X | X | X | X | | X | | X | X | X | | |
| 46 | C ₂₇ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | molinoleína (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 47 | C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂ | monooleína (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 48 | C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si ₂ | monoestaerina (*) | | | | X | | X | X | X | | | X | | | | | |
| 49 | C ₃₀ H ₅₀ | escaleno | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 50 | C ₂₈ H ₄₈ O | brassicasterol | X | | X | | | | | | X | X | | X | X | X | | X |
| 51 | C ₂₉ H ₄₈ O | estigmastadienol | X | X | X | | | | | | X | X | X | | X | X | X | X |
| 52 | C ₂₉ H ₅₀ O | clionasterol | X | X | X | | | X | X | | X | X | X | X | X | X | | X |
| 53 | C ₃₁ H ₅₆ OSi | estigmasterol (*) | | | X | X | X | X | X | | | | | X | | | | X |
| 54 | C ₃₂ H ₅₆ OSi | estigmasterol (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | | | X | | | | | X |
| 55 | C ₃₂ H ₅₈ OSi | sitosterol(*) | | X | | X | X | X | X | X | | | X | | | | | X |

(*) detectado como derivado siliizado (TMS).

Tabela 1.3: SOLVENTE: ACETATO DE ETILA

| N° | fórmula | nome | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|----|--|------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|
| 1 | C ₈ H ₁₈ O ₂ Si | ácido propanóico (*) | | X | X | X | X | | | X | X | X | | X | X | | X | X |
| 2 | C ₁₁ H ₁₈ OSi | feniletanol (*) | | X | | | X | | | X | | | | X | | | | |
| 3 | C ₉ H ₁₈ O ₄ Si | succinato de etila (*) | | | | | | | | | | | | X | | | | |
| 4 | C ₁₂ H ₃₀ O ₄ Si | trietilenoglicol (*) | | | | | | | | | | | | | | | | X |
| 5 | C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si | ácido caprílico(*) | X | X | X | X | X | X | T | X | X | X | X | X | X | | X | X |
| 6 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃ | glicerol(*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | | X | X |
| 7 | C ₁₀ H ₁₆ O | decadienal | X | | | X | | X | X | X | | | X | | | X | | X |
| 8 | C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | caprilato de etila | | | X | X | | | | | | | | | | | | |
| 9 | C ₁₀ H ₂₂ O ₄ Si ₂ | ácido succínico (*) | | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | | | | X |
| 10 | C ₁₂ H ₂₄ O ₂ | caprato de etila | X | X | X | X | X | X | X | | | X | X | X | X | | | |
| 11 | C ₁₂ H ₂₆ O ₂ Si | ácido pelargonico(*) | X | X | X | X | X | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 12 | C ₁₃ H ₂₈ O ₂ Si | ácido cáprico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 13 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | laurato de etila | X | | X | X | X | X | | X | X | | X | | | | | |
| 14 | C ₁₅ H ₃₂ O ₂ Si | ácido laurico (*) | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 15 | C ₁₅ H ₃₂ O ₄ Si ₂ | ácido azelaico (*) | X | | | | | | X | | | | X | | X | X | X | |
| 16 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | miristato de etila | X | | | X | X | | | | | | X | | | | | |
| 17 | C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si | ácido mirístico(*) | X | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | | | X | X |
| 18 | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | palmitato de metila | X | | | X | X | X | | X | X | | X | X | | X | X | X |
| 19 | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | palmitoleato de etila | | X | X | X | X | | X | | | | | | | | | |
| 20 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | palmitato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 21 | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ Si | ácido palmitoleico | X | | | | X | X | X | X | X | X | X | X | | | X | X |
| 22 | C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si | ácido palmitico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 23 | C ₁₉ H ₃₄ O ₂ | linoleato de metila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 24 | C ₁₉ H ₃₆ O ₂ | oleato de metila | X | X | X | X | X | X | | X | | X | X | X | X | | | X |
| 25 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | linoleato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 26 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | oleato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 27 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | linolenato de etila | | | | X | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | | |
| 28 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | estearato de etila | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 29 | C ₂₀ H ₃₆ O ₂ | ácido linoléico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 30 | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | ácido oléico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 31 | C ₂₀ H ₃₄ O ₂ | ácido linolénico (*) | X | | | | X | X | X | X | T | X | X | X | X | X | X | X |
| 32 | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | ácido esteárico (*) | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 33 | C ₂₃ H ₄₃ OSi | ácido araquídico (*) | | | | | | | | X | | | | | | | | |
| 34 | C ₂₅ H ₅₂ OSi | ácido lignocérico (*) | | | | | X | | | | | | X | | | | | X |
| 35 | C ₂₅ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | monopalmitina (*) | | | | X | X | | X | X | | | X | X | X | | | X |
| 36 | C ₂₇ H ₅₄ O ₄ Si ₂ | molinoleína (*) | X | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 37 | C ₂₇ H ₅₆ O ₄ Si ₂ | monoolena (*) | X | | | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 38 | C ₂₇ H ₅₈ O ₄ Si ₂ | monoesterina (*) | X | | | | X | X | X | | | | X | | | | | |
| 39 | C ₃₀ H ₅₀ | escaleno | X | | | X | X | X | | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| 40 | C ₂₈ H ₄₈ O | brassicasterol | | X | X | | X | | | | X | | | X | | X | X | X |
| 41 | C ₂₉ H ₄₈ O | estigmastadienol | | X | X | X | | | | | X | | | X | | X | X | X |
| 42 | C ₂₉ H ₅₀ O | clionasterol | X | | | X | X | | | | X | | | X | | X | X | X |
| 43 | C ₃₁ H ₅₆ OSi | estigmasterol | X | | | | | X | | X | | | X | | | | | |
| 44 | C ₃₂ H ₅₆ OSi | estigmasterol (*) | X | X | | | X | X | | X | | | X | | X | | | |
| 45 | C ₃₂ H ₅₈ OSi | sitosterol(*) | X | | X | | X | X | | X | | X | X | | X | | | |

(*) detectado como derivado siliizado (TMS).

ANEXO 2

QUANTIFICAÇÃO (% EM MASSA) DE ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS EM ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA, DA MISTURA DAS VARIEDADES ISABEL E HERBEMONT, EXTRAÍDOS COM LÍQUIDO PRESSURIZADO (PLE) USANDO DIFERENTES SOLVENTES NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2⁵⁻¹.

Tabela 2.1: SOLVENTE: HEXANO

| ácidos | H 1 | H 2 | H 3 | H 4 | H 5 | H 6 | H 7 | H 8 | H 9 | H 10 | H 11 | H 12 | H 13 | H 14 | H 15 | H 16 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C12:0 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | ND | 0,13 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 |
| C14:0 | 0,04 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,04 | 0,02 | 0,02 | 0,04 | 0,02 | 0,02 | 0,04 | 0,02 |
| C16:1 | 0,22 | 0,17 | 0,17 | 0,17 | 0,17 | 0,16 | 0,16 | 0,11 | 0,21 | 0,16 | 0,15 | 0,25 | 0,15 | 0,11 | 0,22 | 0,14 |
| C16:0 | 8,19 | 7,23 | 7,24 | 7,13 | 7,23 | 6,87 | 7,02 | 6,55 | 6,87 | 6,95 | 6,82 | 9,81 | 6,92 | 6,59 | 8,04 | 6,79 |
| C18:2 | 65,04 | 68,10 | 67,97 | 67,58 | 67,98 | 68,07 | 68,04 | 69,03 | 67,88 | 68,27 | 68,24 | 65,70 | 68,19 | 68,98 | 64,61 | 68,76 |
| C18:1 | 21,81 | 20,70 | 20,64 | 21,12 | 20,71 | 20,99 | 20,88 | 20,82 | 19,94 | 20,71 | 20,89 | 18,73 | 20,87 | 20,69 | 22,4 | 20,51 |
| C18:0 | 4,33 | 3,64 | 3,81 | 3,82 | 3,75 | 3,75 | 3,74 | 3,35 | 4,41 | 3,74 | 3,74 | 5,21 | 3,71 | 3,48 | 4,44 | 3,65 |
| C18:3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| C20:0 | 0,12 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,09 | 0,08 | 0,07 | 0,26 | 0,09 | 0,08 | 0,16 | 0,08 | 0,07 | 0,14 | 0,07 |
| C24:0 | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,09 | 0,02 | 0,01 | 0,04 | 0,01 | 0,02 | 0,04 | 0,01 |

NA : Não analisado,

ND não detectado

Tabela 2.2: SOLVENTE: HEXANO: DCM (1:1)

| ácidos | HD 1 | HD 2 | HD 3 | HD 4 | HD 5 | HD 6 | HD 7 | HD 8 | HD 9 | HD 10 | HD 11 | HD 12 | HD 13 | HD 14 | HD 15 | HD 16 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C12:0 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 |
| C14:0 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,02 |
| C16:1 | 0,21 | 0,22 | 0,21 | 0,20 | 0,19 | 0,20 | 0,21 | 0,20 | 0,19 | 0,19 | 0,18 | 0,19 | 0,20 | 0,19 | 0,16 | 0,14 |
| C16:0 | 7,47 | 8,02 | 7,99 | 7,74 | 8,64 | 7,67 | 8,10 | 7,98 | 7,91 | 7,68 | 7,65 | 7,91 | 8,08 | 7,78 | 8,47 | 6,77 |
| C18:2 | 66,96 | 64,80 | 64,97 | 66,09 | 64,89 | 65,70 | 65,00 | 65,21 | 65,29 | 65,40 | 65,63 | 65,59 | 64,79 | 65,75 | 65,58 | 68,09 |
| C18:1 | 21,08 | 22,23 | 22,07 | 21,72 | 21,44 | 21,96 | 22,00 | 21,94 | 21,94 | 22,02 | 21,82 | 21,59 | 22,11 | 21,71 | 21,07 | 20,98 |
| C18:0 | 4,10 | 4,49 | 4,34 | 4,07 | 4,62 | 4,29 | 4,48 | 4,47 | 4,48 | 4,51 | 4,53 | 4,52 | 4,62 | 4,39 | 4,50 | 3,86 |
| C18:3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| C20:0 | 0,11 | 0,14 | 0,00 | 0,11 | 0,13 | 0,12 | 0,13 | 0,12 | 0,13 | 0,13 | 0,13 | 0,12 | 0,13 | 0,11 | 0,13 | 0,10 |
| C24:0 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,02 | 0,04 | 0,02 | 0,03 | 0,03 | 0,02 | 0,04 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,03 | 0,02 |

NA : Não analisado,

ND não detectado

Tabela 2.3: SOLVENTE: DICLOROMETANO

| ácidos | D 1 | D 2 | D 3 | D 4 | D 5 | D 6 | D 7 | D 8 | D 9 | D 10 | D 11 | D 12 | D 13 | D 14 | D 15 | D 16 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C12:0 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| C14:0 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| C16:1 | 0,20 | 0,19 | 0,20 | 0,22 | 0,21 | 0,22 | 0,19 | 0,17 | 0,17 | 0,19 | 0,19 | 0,17 | 0,19 | 0,18 | 0,18 | 0,23 |
| C16:0 | 6,88 | 6,90 | 7,22 | 8,06 | 7,65 | 7,86 | 7,60 | 7,41 | 7,24 | 7,81 | 7,56 | 7,62 | 7,51 | 7,61 | 7,52 | 7,95 |
| C18:2 | 65,61 | 67,01 | 68,62 | 69,12 | 67,97 | 67,23 | 67,90 | 68,29 | 67,70 | 67,34 | 67,22 | 67,95 | 67,05 | 66,91 | 67,16 | 65,73 |
| C18:1 | 22,90 | 21,92 | 20,41 | 19,05 | 20,23 | 20,40 | 20,14 | 19,83 | 20,72 | 20,28 | 20,66 | 20,09 | 20,80 | 20,75 | 20,64 | 20,55 |
| C18:0 | 4,16 | 3,68 | 3,36 | 3,37 | 3,75 | 4,09 | 3,97 | 4,12 | 3,96 | 4,19 | 4,18 | 3,95 | 4,26 | 4,35 | 4,30 | 5,26 |
| C18:3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| C20:0 | 0,13 | 0,13 | 0,10 | 0,10 | 0,11 | 0,12 | 0,11 | 0,12 | 0,11 | 0,12 | 0,12 | 0,13 | 0,10 | 0,13 | 0,12 | 0,18 |
| C24:0 | 0,09 | 0,13 | 0,05 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,05 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,04 |

NA : Não analisado,

ND não detectado

Tabela 2.4: SOLVENTE: ACETATO DE ETILA

| ácidos | AE1 | AE 2 | AE 3 | AE 4 | AE 5 | AE. 6 | AE 7 | AE 8 | AE 9 | AE 10 | AE 11 | AE 12 | AE 13 | AE 14 | AE 15 | AE 16 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C12:0 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| C14:0 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,03 |
| C16:1 | 0,22 | 0,24 | 0,24 | 0,22 | 0,25 | 0,23 | 0,23 | 0,23 | 0,25 | 0,22 | 0,16 | 0,22 | 0,23 | 0,22 | 0,23 | 0,19 |
| C16:0 | 7,93 | 8,23 | 8,27 | 7,88 | 8,52 | 8,17 | 8,05 | 9,67 | 7,90 | 8,03 | 8,61 | 7,89 | 7,77 | 7,90 | 8,42 | 7,54 |
| C18:2 | 65,34 | 64,95 | 64,59 | 65,36 | 62,59 | 64,97 | 65,23 | 64,21 | 65,56 | 65,45 | 67,03 | 65,73 | 65,32 | 65,65 | 63,18 | 65,67 |
| C18:1 | 21,94 | 21,83 | 21,89 | 21,85 | 21,87 | 21,64 | 21,86 | 20,68 | 21,77 | 21,72 | 18,70 | 21,38 | 22,02 | 21,69 | 21,99 | 21,99 |
| C18:0 | 4,31 | 4,52 | 4,49 | 4,20 | 5,16 | 4,54 | 4,42 | 4,93 | 4,31 | 4,33 | 4,96 | 4,57 | 4,43 | 4,32 | 4,82 | 4,41 |
| C18:3 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| C20:0 | 0,14 | 0,14 | 0,14 | 0,13 | 0,21 | 0,14 | 0,13 | 0,16 | 0,13 | 0,13 | 0,15 | 0,14 | 0,14 | 0,13 | 0,20 | 0,13 |
| C24:0 | 0,06 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,03 | 0,06 | 0,02 | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,05 | 0,03 |

NA : Não analisado,

ND não detectado

ÓLEO DE SEMENTE DE UVA – RESULTADOS E DISCUSSÕES

ANEXO 3

TABELA 3.1: ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA ISABEL/HERBEMONT, EXTRAÍDOS POR PLE COM HEXANO, SEGUNDO O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2⁵⁻¹

| ECN | Nome | experimento | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 38 | LLnLn | 0,30 | ND | 0,27 | 0,31 | ND | 0,20 | 0,33 | ND | 0,09 | 0,34 | 0,29 | 0,13 | 0,36 | 0,31 | 0,71 | 0,55 |
| | isômero | 0,10 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 40 | LLLn | 0,85 | 9,73 | 0,54 | 0,65 | 0,00 | 0,69 | 0,73 | 4,98 | 0,10 | 0,71 | 0,78 | 0,00 | 0,64 | 0,80 | 0,43 | 0,68 |
| | isômero | 0,05 | ND | ND | ND | 2,11 | ND | 0,06 | ND | ND | 0,18 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 42 | LLL | 40,92 | 41,20 | 40,98 | 41,16 | 25,80 | 40,45 | 40,86 | 41,74 | 42,94 | 40,91 | 41,61 | 46,38 | 43,26 | 44,60 | 40,75 | 41,73 |
| | PLLn | 0,07 | 0,49 | ND | ND | 7,79 | 0,35 | 0,05 | ND | ND | ND | 0,63 | ND | 0,16 | ND | ND | ND |
| 44 | OLL | 21,23 | 17,47 | 20,72 | 21,27 | 22,73 | 21,10 | 20,47 | 20,13 | 26,72 | 20,59 | 20,46 | 20,23 | 20,48 | 22,27 | 21,67 | 21,17 |
| | PLL | 13,86 | 6,96 | 13,12 | 13,80 | 4,57 | 13,84 | 13,59 | 11,15 | 7,87 | 13,38 | 13,53 | 11,79 | 14,18 | 14,14 | 12,75 | 14,08 |
| 46 | OOL | 4,99 | 7,68 | 5,74 | 4,90 | 12,21 | 5,41 | 5,24 | 5,67 | 8,31 | 5,39 | 4,25 | 4,91 | 4,60 | 4,45 | 5,55 | 5,46 |
| | POL + StLL | 12,01 | 12,54 | 13,06 | 11,79 | 14,19 | 12,15 | 11,73 | 10,93 | 8,17 | 12,09 | 11,36 | 11,05 | 12,26 | 9,53 | 11,83 | 12,02 |
| | PPL | 0,82 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,14 | 0,06 | 0,16 | ND | ND | 0,11 | 0,35 | ND | 0,07 | 0,12 |
| 48 | OOO | 0,79 | 1,16 | 1,63 | 1,58 | 4,26 | 1,71 | 1,74 | 1,52 | 2,28 | 1,89 | 1,53 | 0,79 | 1,29 | 0,82 | 1,42 | 0,84 |
| | StOL + ? | 4,01 | 2,78 | 2,03 | 3,94 | 5,50 | 3,93 | 4,12 | 3,39 | 3,01 | 4,07 | 3,59 | 2,55 | 1,76 | 2,58 | 3,87 | 3,22 |
| | (POP) | ND | ND | 1,90 | 0,52 | 0,05 | ND | 0,37 | 0,42 | ND | 0,45 | 0,40 | 0,82 | ND | ND | 0,44 | ND |
| | PPP | ND | ND | ND | ND | 0,28 | ND | 0,58 | ND | 0,22 | ND | 1,44 | 1,21 | ND | 0,52 | 0,51 | 0,13 |
| ? | ND | ND | ND | 0,09 | 0,50 | ND | ND | ND | 0,00 | ND | ND | ND | 0,66 | ND | ND | ND | |
| ? | ND | ND | ND | ND | ND | 0,16 | ND | ND | 0,13 | ND | 0,13 | ND | ND | ND | ND | ND | |

ÓLEO DE SEMENTE DE UVA – RESULTADOS E DISCUSSÕES

TABELA 3.2: ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA ISABEL/HERBEMONT, EXTRAÍDOS POR PLE COM HEXANO/DCM, SEGUNDO O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2⁵⁻¹

| ECN | Nome | experimento | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 38 | LLnLn | 0,30 | ND | 0,27 | 0,31 | ND | 0,20 | 0,33 | ND | 0,09 | 0,34 | 0,29 | 0,13 | 0,36 | 0,31 | 0,71 | 0,55 |
| | isômero | 0,10 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 40 | LLLn | 0,85 | 9,73 | 0,54 | 0,65 | ND | 0,69 | 0,73 | 4,98 | 0,10 | 0,71 | 0,78 | ND | 0,64 | 0,80 | 0,43 | 0,68 |
| | isômero | 0,05 | ND | ND | ND | 2,11 | ND | 0,06 | ND | ND | 0,18 | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| 42 | LLL | 40,92 | 41,20 | 40,98 | 41,16 | 25,80 | 40,45 | 40,86 | 41,74 | 42,94 | 40,91 | 41,61 | 46,38 | 43,26 | 44,60 | 40,75 | 41,73 |
| | PLLn | 0,07 | 0,49 | ND | ND | 7,79 | 0,35 | 0,05 | ND | ND | ND | 0,63 | ND | 0,16 | ND | ND | ND |
| 44 | OLL | 21,23 | 17,47 | 20,72 | 21,27 | 22,73 | 21,10 | 20,47 | 20,13 | 26,72 | 20,59 | 20,46 | 20,23 | 20,48 | 22,27 | 21,67 | 21,17 |
| | PLL | 13,86 | 6,96 | 13,12 | 13,80 | 4,57 | 13,84 | 13,59 | 11,15 | 7,87 | 13,38 | 13,53 | 11,79 | 14,18 | 14,14 | 12,75 | 14,08 |
| 46 | OOL | 4,99 | 7,68 | 5,74 | 4,90 | 12,21 | 5,41 | 5,24 | 5,67 | 8,31 | 5,39 | 4,25 | 4,91 | 4,60 | 4,45 | 5,55 | 5,46 |
| | POL + StLL | 12,01 | 12,54 | 13,06 | 11,79 | 14,19 | 12,15 | 11,73 | 10,93 | 8,17 | 12,09 | 11,36 | 11,05 | 12,26 | 9,53 | 11,83 | 12,02 |
| | PPL | 0,82 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,14 | 0,06 | 0,16 | ND | ND | 0,11 | 0,35 | ND | 0,07 | 0,12 |
| 48 | OOO | 0,79 | 1,16 | 1,63 | 1,58 | 4,26 | 1,71 | 1,74 | 1,52 | 2,28 | 1,89 | 1,53 | 0,79 | 1,29 | 0,82 | 1,42 | 0,84 |
| | StOL + ? | 4,01 | 2,78 | 2,03 | 3,94 | 5,50 | 3,93 | 4,12 | 3,39 | 3,01 | 4,07 | 3,59 | 2,55 | 1,76 | 2,58 | 3,87 | 3,22 |
| | (POP) | 0,00 | 0,00 | 1,90 | 0,52 | 0,05 | ND | 0,37 | 0,42 | 0,00 | 0,45 | 0,40 | 0,82 | ND | ND | 0,44 | ND |
| | PPP | ND | ND | ND | ND | 0,28 | ND | 0,58 | ND | 0,22 | ND | 1,44 | 1,21 | ND | 0,52 | 0,51 | 0,13 |
| ? | ND | ND | ND | 0,09 | 0,50 | ND | ND | ND | 0,00 | ND | ND | ND | 0,66 | ND | ND | ND | |
| ? | ND | ND | ND | ND | ND | 0,16 | ND | ND | 0,13 | ND | 0,13 | ND | 0 | ND | ND | ND | |

ÓLEO DE SEMENTE DE UVA – RESULTADOS E DISCUSSÕES

TABELA 3.3: ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA ISABEL/HERBEMONT, EXTRAÍDOS POR PLE COM DICLOROMETANO, SEGUNDO O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2⁵⁻¹

| ECN | Nome | experimentos | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 38 | LLnLn | 0,23 | 0,20 | 0,23 | 0,18 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,25 | 0,20 | 0,27 | 0,25 | 0,27 | 0,21 | 0,27 |
| | isômero | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0,02 | ND | ND | ND | 0,15 | ND | ND | ND | 0,13 | ND |
| 40 | LLLn | 0,63 | 0,59 | 0,63 | 0,61 | 0,61 | 0,64 | 0,59 | 0,65 | 0,59 | 0,62 | 0,87 | 0,69 | 0,64 | 0,64 | 0,42 | 0,66 |
| | isômero | ND | ND | ND | ND | ND | 0,03 | 0,02 | ND | ND | ND | 0,12 | ND | ND | 0,05 | 0,70 | 0,14 |
| 42 | LLL | 40,84 | 38,93 | 42,44 | 41,49 | 40,83 | 41,17 | 42,18 | 42,57 | 41,35 | 41,44 | 40,67 | 42,33 | 41,12 | 42,54 | 42,22 | 41,18 |
| | PLLn | ND | ND | ND | 0,67 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0,17 | ND | ND | 0,08 | ND | 0,37 |
| 44 | OLL | 20,61 | 20,32 | 19,72 | 21,17 | 20,61 | 20,65 | 20,81 | 21,07 | 21,23 | 20,92 | 21,10 | 21,06 | 20,77 | 21,19 | 20,47 | 21,13 |
| | PLL | 13,59 | 14,56 | 15,25 | 13,84 | 13,58 | 13,85 | 14,01 | 14,28 | 13,85 | 14,21 | 13,82 | 14,14 | 13,73 | 13,42 | 13,33 | 14,02 |
| 46 | OOL | 5,39 | 5,57 | 4,24 | 4,99 | 5,39 | 5,31 | 5,26 | 5,17 | 5,37 | 4,94 | 3,73 | 5,01 | 5,69 | 5,39 | 4,24 | 4,98 |
| | POL + StLL | 11,89 | 11,50 | 11,60 | 11,42 | 11,89 | 11,86 | 11,65 | 11,81 | 12,30 | 11,81 | 11,76 | 11,34 | 12,40 | 11,57 | 11,08 | 11,83 |
| 48 | PPL | ND | ND | ND | ND | 0,07 | 0,07 | 0,07 | ND | 0,08 | 0,15 | 0,05 | 0,10 | 0,22 | 0,11 | 0,10 | 0,23 |
| | OOO | 1,74 | 1,72 | 0,28 | 1,38 | 1,74 | 1,79 | 1,14 | 0,95 | 1,04 | 1,14 | 1,90 | 0,84 | 1,13 | 1,03 | 1,96 | 1,39 |
| 48 | StOL + ? | 3,96 | 4,17 | 4,58 | 4,08 | 3,96 | 3,96 | 3,46 | 3,11 | 3,18 | 2,96 | 5,19 | 3,27 | 3,57 | 3,18 | 4,29 | 3,33 |
| | (POP) | ND | 0,86 | 0,04 | 0,07 | 0,28 | 0,49 | 0,45 | 0,39 | 0,72 | 0,80 | 0,26 | 0,29 | 0,47 | 0,51 | 0,44 | ND |
| ?? | PPP | 1,13 | 1,59 | 0,35 | 0,08 | 1,04 | 0,18 | 0,34 | ND | 0,28 | 0,74 | ND | 0,66 | ND | ND | 0,40 | 0,48 |
| ?? | ?? | ND | ND | 0,65 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

TABELA 3.4: ÓLEOS DE SEMENTE DE UVA ISABEL/HERBEMONT, EXTRAÍDOS POR PLE COM ACETATO DE ETILA, SEGUNDO O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL 2⁵⁻¹

| ECN | Nome | experimentos | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 38 | LLnLn | ND | ND | 0,46 | 0,22 | ND | ND | ND | ND | 0,48 | 0,43 | 0,74 | 0,41 | ND | ND | 0,54 | 0,26 |
| 40 | LLLn | 4,26 | 3,50 | 0,57 | ND | 0,53 | ND | ND | 8,40 | ND | 13,25 | 0,86 | ND | ND | 1,92 | 0,72 | 2,11 |
| 42 | LLL | 40,13 | 42,41 | 39,99 | 47,64 | 41,42 | 52,36 | 43,26 | 42,65 | 43,90 | 38,44 | 41,21 | 46,86 | 44,00 | 40,94 | 40,81 | 39,43 |
| 44 | OLL | 21,11 | 20,53 | 19,76 | 13,27 | 23,06 | 18,34 | 14,37 | 13,04 | 20,60 | 16,39 | 21,24 | 13,01 | 21,48 | 20,98 | 21,40 | 21,65 |
| | PLL | 10,58 | 10,07 | 14,08 | 16,20 | 13,92 | 6,61 | 5,57 | 5,44 | 7,59 | 6,82 | 13,74 | 4,67 | 10,24 | 10,22 | 10,95 | 10,43 |
| | OOL | 6,76 | 6,07 | 5,05 | 12,37 | 6,20 | ND | 13,03 | 12,27 | 4,50 | 3,44 | 3,60 | 13,56 | 6,33 | 6,84 | 8,03 | 0,19 |
| 46 | POL + StLL | 11,39 | 11,06 | 12,60 | 4,72 | 11,50 | 3,65 | 13,03 | 12,31 | 8,48 | 7,53 | 11,38 | 11,93 | 10,85 | 10,76 | 12,86 | 8,27 |
| | PPL | 0,15 | 0,20 | 0,20 | 5,04 | ND | 7,77 | 0,48 | ND | 0,29 | ND | 0,13 | ND | 0,06 | 0,20 | ND | 11,96 |
| | OOO | 1,37 | 1,56 | 1,67 | 0,07 | 2,71 | 4,45 | 4,00 | 1,40 | 6,10 | 6,26 | 1,83 | 4,24 | 2,20 | 2,87 | 0,99 | 0,23 |
| 48 | StOL + ? | 3,86 | 4,00 | 4,66 | 0,10 | ND | 6,82 | 5,84 | 4,49 | 7,44 | 7,43 | 5,02 | 5,32 | 4,51 | 4,72 | 3,69 | 1,33 |
| | (POP) | 0,00 | 0,60 | 0,45 | 0,19 | 0,34 | ND | 0,43 | ND | ND | ND | 0,25 | ND | 0,33 | 0,34 | ND | 3,66 |
| | PPP | 0,41 | ND | 0,38 | 0,19 | 0,33 | ND | ND | ND | 0,24 | ND | ND | ND | ND | 0,21 | ND | 0,50 |
| ?? | ?? | ND | ND | 0,14 | ND | ND | ND | ND | ND | 0,19 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |

Tabela 3.5: Óleos de semente de uva Isabel/Herbemont, extraídos por SFE com dióxido de carbono e propano

| | Nome | prop1 | prop2 | CO ₂ -1 | CO ₂ -2 | CO ₂ -3 | CO ₂ -7 | CO ₂ -9 |
|----|------------|-------|-------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 38 | LLnLn | ND | 0,28 | 0,03 | 0,09 | 0,31 | 0,31 | ND |
| 40 | LLLn | 0,67 | 0,64 | 0,84 | ND | 0,55 | 0,61 | ND |
| | isômero | ND | ND | 0,22 | ND | ND | 0,03 | ND |
| 42 | LLL | 40,59 | 41,16 | 41,84 | 43,57 | 40,52 | 40,75 | 42,92 |
| | PLLn | 0,43 | ND | 0,11 | ND | 0,45 | 0,44 | 0,40 |
| 44 | OLL | 20,11 | 19,89 | 19,60 | 25,92 | 19,78 | 19,74 | 20,84 |
| | PLL | 14,27 | 14,52 | 15,09 | 7,90 | 14,33 | 14,53 | 14,69 |
| 46 | OOL | 5,06 | 4,87 | 5,31 | 7,48 | 4,96 | 4,93 | 3,84 |
| | POL + StLL | 12,16 | 12,48 | 10,85 | 8,86 | 12,36 | 12,08 | 12,35 |
| | PPL | 0,06 | 0,11 | 0,05 | 0,27 | 0,20 | 0,06 | 0,14 |
| 48 | OOO(100) | 1,56 | 1,54 | 1,19 | 2,31 | 1,48 | 1,51 | 1,35 |
| | StOL + ? | 4,39 | 3,90 | 4,79 | 3,50 | 4,33 | 4,32 | 3,04 |
| | (POP) | 0,35 | 0,30 | ND | ND | 0,29 | 0,35 | ND |
| | PPP | 0,35 | 0,30 | 0,08 | 0,11 | 0,44 | 0,37 | 0,44 |

Tabela 3.6: Óleos de semente de uva Isabel/Herbemont, extraídos por SFE com dióxido de carbono e diferentes solventes extratores

| ECN | Nome | hexano | HD | DCM | AE | Metanol | etanol | | | | |
|-----|------------|--------|-------|-------|-------|---------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | | | | 3% | 5% | 10% | 15% | 20% |
| 38 | LLnLn | ND | 0,13 | ND | 0,13 | ND | 0,13 | ND | ND | ND | ND |
| 40 | LLLn | ND | 0,60 | ND | 0,47 | ND | ND | ND | 0,72 | 0,50 | 0,54 |
| 42 | LLL | 43,53 | 42,15 | 43,50 | 42,92 | 43,53 | 44,31 | 44,63 | 43,11 | 41,83 | 42,18 |
| | PLLn | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2,36 | 2,17 | 2,32 |
| 44 | OLL | 20,42 | 23,04 | 20,59 | 23,42 | 20,42 | 18,82 | 29,62 | 19,36 | 18,65 | 19,13 |
| | PLL | 11,32 | 11,33 | 11,06 | 11,28 | 11,32 | 5,09 | 5,65 | 16,52 | 16,09 | 15,75 |
| 46 | OOL | 5,77 | 5,58 | 4,89 | 5,46 | 5,77 | 10,26 | 7,19 | 3,71 | 3,60 | 3,57 |
| | POL + StLL | 12,77 | 11,09 | 12,20 | 11,02 | 12,77 | 12,35 | 6,24 | 9,74 | 11,92 | 10,61 |
| | PPL | ND | 0,02 | ND | 0,03 | ND | 0,13 | 0,07 | ND | ND | ND |
| 48 | OOO | 1,51 | 1,53 | 1,92 | 1,31 | 1,51 | 3,58 | 3,77 | 0,84 | 1,10 | 1,14 |
| | StOL + ? | 4,49 | 4,09 | 4,63 | 3,80 | 4,49 | 5,14 | 2,63 | 3,00 | 3,66 | 3,23 |
| | (POP) | ND | ND | 0,39 | ND | ND | ND | ND | 0,42 | 0,37 | 0,70 |
| | PPP | 0,19 | 0,44 | 0,84 | 0,16 | 0,19 | 0,19 | 0,21 | 0,21 | 0,12 | 0,83 |

HD = hexano/diclorometano (1:1), DCM= diclorometano; AE = acetato de etila

ANEXO 4

Tabela 4.1: Coeficientes do modelo experimental construído para α -tocoferol presentes no óleo de semente de uva extraído por PLE com diferentes solventes da mistura de sementes de uva das variedades Isabel e Herbemont.

| coeficientes | H | HD | DCM | AE |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| A0 | 1,82 | 1,88 | 1,60 | 1,61 |
| A1 | -0,41 | 0,25 | -0,22 | -0,44 |
| A2 | 0,67 | -0,18 | -1,00 | -0,54 |
| A3 | -0,24 | -0,11 | -0,12 | 0,86 |
| A4 | 0,33 | -0,89 | 0,12 | 0,07 |
| A5 | -0,82 | -0,50 | -0,28 | 0,38 |
| A1A2 | -0,50 | 0,12 | -0,08 | 0,82 |
| A1A3 | 0,48 | 0,24 | 0,33 | 0,13 |
| A1A4 | 0,46 | 0,33 | 0,51 | 0,22 |
| A1A5 | -0,23 | 0,18 | -0,03 | 0,05 |
| A2A3 | -0,27 | 0,41 | 0,18 | 0,42 |
| A2A4 | 0,08 | -0,46 | -0,47 | -0,28 |
| A2A5 | 0,09 | 0,26 | 0,01 | 0,31 |
| A3A4 | 0,32 | 0,37 | 0,06 | -0,07 |
| A3A5 | 0,26 | -0,33 | -0,05 | 1,01 |
| A4A5 | 0,56 | -0,34 | 0,30 | 0,11 |